

# ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

PUBLIÉES PAR

LA DIRECTION DE L'INSTITUT PASTEUR

Avec le concours des Chefs de Service  
et des Chefs de Laboratoire

Secrétaire général : P. LÉPINE



---

MASSON ET C<sup>IE</sup>, ÉDITEURS

Libraires de l'Académie de Médecine  
120, Boulevard Saint-Germain

PARIS

---



## SOMMAIRE DU N° 2

- Existence à Madagascar de l'encéphalomyélite enzootique des porcs. Immunité croisée avec le virus de la maladie de Teschen. Transmission au sanglier, par P. LÉPINE et P. ATANASIU . . . . .
- Étude de l'enlèvement par divers agents chimiques du cuivre combiné aux protéines, par FERNAND PASQUIER et MICHEL MACHEBOEUR . . . . .
- Un nouveau test de physio-pathologie : la fiche réticulo-endothéliale, par G. SANDOR et J. CH. WEILL-KAGE . . . . .
- Recherches sur la sensibilité *in vitro* du bacille du rouget aux antibiotiques, par J. VERGE, P. GORET, L. JOUBERT et L. CAUCHY (avec la collaboration de G. SAUGÉ et M. ANGOT . . . . .
- Recherches sur la sensibilité *in vivo* du bacille du rouget aux antibiotiques, par J. VERGE, P. GORET, L. JOUBERT et L. CAUCHY (avec la collaboration de G. SAUGÉ et M. ANGOT . . . . .
- Les coliformes et groupes voisins, par J. BRISOU . . . . .
- Influence du facteur lumière sur le temps d'incubation de la mosaïque du tabac, par D. SCHWARTZ et J. CUZIN . . . . .
- Sur le choix des souches étalons pour la détection du bacille typhique dans les eaux par la recherche des bactériophages spécifiques, par A. GUÉLIN . . . . .
- Société française de Microbiologie (Sommaire page 4 de la couverture) . . . . .

**Œuvres de Pasteur** réunies par PASTEUR VALLERY-RADOT, tome « Mélanges scientifiques et littéraires. Index analytique de l'œuvre Pasteur ». Un vol. gr. in-8° de 666 pages. Masson et C<sup>ie</sup>, édit., Paris, 1939.

**Albert Calmette. Sa vie. Son œuvre scientifique**, par P.-NOËL BERNARD et LÉOPOLD NEGRE. *Préface de Pasteur Vallery-Radot. Avant-propos de A. Yersin.* Un vol. de 274 pages. Masson et C<sup>ie</sup>, édit., Paris, 1939.

J. BORDET. — **Traité de l'immunité dans les maladies infectieuses**. Deuxième édit. Un volume de 880 pages. Masson et C<sup>ie</sup>, édit., Paris, 1939.

ANDRÉ-R. PREVOT. — **Manuel de classification et de détermination bactéries anaérobies**. Un volume in-8° de 290 pages, 2<sup>e</sup> édition (*Monographie de l'Institut Pasteur*). Masson et C<sup>ie</sup>, édit., Paris, 1948.

MARGUERITE LWOFF. — **Recherches sur le pouvoir de synthèse flagellés trypanosomides**. Un vol. de 244 pages (*Monographie de l'Institut Pasteur*). Masson et C<sup>ie</sup>, édit., Paris, 1941.

EDM. SERGENT, A. DONATIEN, L. PARROT et F. LESTOQUARD (*in memoriam*). — **Études sur les piroplasmoses bovines**. Un vol. in-16 de 316 pages, 325 illustrations, 1945 (*Institut Pasteur, Alger*).

N. B. — Le paiement est accepté en toutes monnaies étrangères au cours du dollar au moment du règlement.

### PRIX DE L'ABONNEMENT POUR 1950

France et Union Française . . . . . Fr. 2.000

(Règlement par mandat, chèques postaux [Compte n° 599 Paris]  
ou chèque bancaire.)

Belgique et Luxembourg . . . . . Fr. B. 300

Autres pays . . . . . \$ U. S. A.

Prix également payables dans les autres monnaies  
au cours des règlements commerciaux le jour du paiement.

(Règlement par Banque Nationale.)

Changement d'adresse : 20 fr.

Secrétariat, 25, rue du Docteur-Roux, Paris (XV<sup>e</sup>).

Publication mensuelle.



# Maladies Exotiques

## THÉRAPEUTIQUE



### LEISHMANIOSE

GLUCANTIME

### AMIBIASE

MIXIOD, RHODIACARBINE,  
STOVAR SOL.

### BILHARZIOSE

ANTHIOMALINE

### LÈPRE

HYRGANOL,  
CIMÉDONE

### PALUDISME

CHLORIGUANE, NIVAQUINE,  
PRÉMALINE N, RODOPRÉQUINE,  
QUINIO - STOVAR SOL.

### DYSENTERIE

### BACILLAIRE

GANIDAN

### SPRUE

FOLDINE

### FILARIOSE

NOTÉZINE

### TRYPANOSOMIASE

LOMIDINE, MORANYL,  
ORSANINE SODIQUE,  
TRYPARSAMIDÉ.

### PIAN.

ACÉTYLARSAN, FONTARSOL,  
NOVARSÉNOBENZOL. BILLON,  
STOVAR SOL.

### TRACHOME

SOLUFONTAMIDE

**SOCIÉTÉ PARISIENNE D'EXPANSION CHIMIQUE**  
"SPECIA"

INFORMATION MÉDICALE - 28, COURS ALBERT 1<sup>er</sup> - PARIS (8<sup>e</sup>). TEL: BAL. 10-70



Ancienne Maison WIESNEGG (1831-1892)  
» » P. LEQUEUX (1892-1918)  
» » R. LEQUEUX (1918-1948)

**Ét<sup>s</sup> LEQUEUX**

S. A. R. L

64, Rue Gay-Lussac - PARIS-5<sup>e</sup>

Télégr. : Wiesnegg-Paris-33 Tél. : ODEON 06-25  
R. C. Seine 340.141 B

**AUTOCLAVES  
ALAMBICS  
ÉTUVES - BAINS-MARIE  
FOURS - BRULEURS**

Matériels de :  
**STÉRILISATION  
DÉSINFECTION  
TRAITEMENT DU LAIT**

**APPAREILS SPÉCIAUX SUIVANT PLANS**

**FILTRE CHAMBERLAND SYSTÈME PASTEUR**

80 BIS, RUE DUTOT — PARIS-XV<sup>e</sup> VAUGIRARD 26-53

LE SEUL FILTRE MIS AU POINT DANS LE LABORATOIRE DE PASTEUR  
ET AUTORISÉ PAR LUI A PORTER SON NOM

===== STÉRILISATION A FROID =====  
APPLICATION PARTICULIÈRE A L'ÉPURATION DES EAUX  
BOUGIES SPÉCIALES POUR L'USAGE DU LABORATOIRE

**Imprimerie Paul LEROUX**

13, RUE NICOLAS-FORTIN - PARIS

.....  
**IMPRIMERIE**

**PAPETERIE**

.....  
**CARTONNAGE**

===== SPÉCIALITÉ DE BOITES PLIANTES =====



MANUFACTURE DE GRILLAGES ET TOLERIE  
**CAGES POUR ÉTUDES BACTÉRIOLOGIQUES**

SOCIÉTÉ DES  
ÉTABLISSEMENTS

**PIARRETTE**

FONDÉS  
EN 1905

Société à Responsabilité Limitée au Capital de 300.000 Francs

SERVICE COMMERCIAL : 17, RUE DES GRANDS-AUGUSTINS, PARIS-6<sup>e</sup>

C. C. Postaux : Paris 1361-76

TÉL. : DANTON 97-75

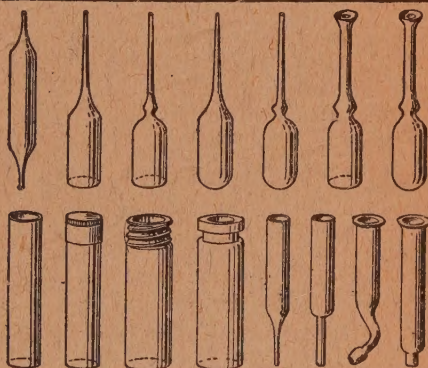
Reg. Com. Seine 291.124 B

Fournisseur de l'Institut Pasteur et de la Faculté de Médecine.

**Verre  
Vitrification**

5, Rue de Crimée

PARIS-XIX<sup>e</sup>



**MACHINES A IMPRIMER**

OYONNAX -  - FRANCE

10, Boulevard Dupuy — Tél. 3-55

**MACHINES SPÉCIALES POUR L'IMPRESSION  
DES AMPOULES ET DES FLACONS**

CATALOGUE SUR DEMANDE

représentant : **R. CHAMOUSSET**, 8, rue Nicolas-Charlet, **PARIS-XV**



# PEPTONE DEFRESNE

Pour PRÉPARATIONS PHYSIOLOGIQUES

*Employée par l'Institut Pasteur*

LABORATOIRE VAILLANT-DEFRESNE

— 77, rue Falguière — PARIS (15<sup>e</sup>) —

## FOURNITURES POUR LABORATOIRES

### VERRERIE GÉNÉRALE

Verre ordinaire, Bohème, Pyrex

Verrerie soufflée et graduée

Aérométrie. Densimétrie

Thermométrie — Porcelaine

Papiers à filtrer - Caoutchouc

Appareillage

TOUTES PIÈCES SUR CROQUIS

**CHOLIN & C<sup>IE</sup>** 39-41 RUE DES CLOYS, PARIS (18<sup>e</sup>)

Tél.: Montmartre 61-81

Catalogue Général sur demande

# CRÉSYL-JEYES

DESINFECTANT ANTISEPTIQUE

EMPLOYEZ LE " JEYES "

Produit très imité, jamais égalé. Action rapide et constante

La PUISSANCE ANTISEPTIQUE du CRÉSYL-JEYES est DIX FOIS plus grande  
que celle du Crésylol à 50 % de Crésol.

FABRICATION SPÉCIALE ET EXCLUSIVE RÉFÉRENCES ET PRIX SPÉCIAUX AUX ADMINISTRATIONS  
PRODUITS SANITAIRES ET ANTISEPTIQUES

18, Rue Charles-Bassée, FONTENAY-SOUS-BOIS (Seine) Tél.: TREMBLAY 05-17



# ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

## EXISTENCE A MADAGASCAR DE L'ENCÉPHALOMYÉLITE ENZOOTIQUE DES PORCS IMMUNITÉ CROISÉE AVEC LE VIRUS DE LA MALADIE DE TESCHEN TRANSMISSION AU SANGLIER

par P. LÉPINE et P. ATANASIU (\*).

(*Institut Pasteur. Service des Virus.*)

Depuis plusieurs années il a été observé à Madagascar une maladie enzoo-épizootique frappant les élevages porcins de la Grande Ile. Qualifiée au début de peste porcine, la maladie a été rapidement, en raison de ses symptômes, reconnue par les vétérinaires pour être en réalité une maladie différente.

Dans le but d'arriver à établir un diagnostic étiologique, M. G. Bück nous a, à plusieurs reprises, envoyé du matériel d'autopsie provenant notamment de porcs et surtout de porcelets de la région de Tananarive et de celle d'Antsirabé (1).

Dès les premiers examens pratiqués, nous avons observé chez les animaux atteints, des lésions intenses des cornes antérieures

(\*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 2 février 1950.

(1) M. G. Bück, qu'il nous est agréable de remercier ici, a consacré à l'étude de la paralysie contagieuse des porcs de Madagascar et à son épidémiologie un important mémoire à la *Société de Pathologie expérimentale*, séance du 8 mars 1950. Nous y renvoyons le lecteur pour la description clinique des symptômes de la maladie naturelle.



de la moelle, lésions présentant une analogie frappante avec celles de la poliomyélite de l'homme et éminemment suggestives de la maladie de Teschen, ou encéphalomyélite porcine enzootique.

On sait (2) que cette dernière affection, qui a été observée tout d'abord dans le district de Teschen, en Tchécoslovaquie, a diffusé progressivement à l'Autriche, au sud de la Pologne, aux cantons est de la Suisse (Grisons), à la Yougoslavie et à l'Italie. En dehors de quelques cas sporadiques observés en France, en Haute-Saône, la maladie n'a jusqu'ici été décrite nulle part en dehors du foyer européen. Il était donc important de déterminer à quel virus on avait affaire en présence de l'épidémie de Madagascar.

#### I. — ISOLEMENT DU VIRUS.

Nous avons à plusieurs reprises inoculé de jeunes porcs, nés et élevés en France, avec le matériel reçu de Madagascar. Ces essais sont pendant longtemps restés infructueux, ce qui ne doit pas nous surprendre étant donné la fréquence connue de l'autostérilisation dans les maladies à virus neurotropes et particulièrement dans les poliomyélites.

Un nouvel envoi de matériel prélevé dans de bonnes conditions, reçu le 8 septembre 1949, devait nous permettre de réussir à isoler le virus.

Un fragment de moelle provenant de Tananarive est broyé et émulsionné, inoculé par voie intracérébrale le 9 septembre 1949 à un porcelet n° 1. La température de ce dernier s'élève à 39° le 12, à 40° le 14 ; le 15, apparaissent des phénomènes spastiques ; le 16 on note la paralysie qui débute par les membres postérieurs ; le 17, l'animal est quadriplégique et présente une sialorrhée abondante avec chute de la température. Il est sacrifié le même jour. On trouve à l'autopsie une hépatisation du tiers inférieur du poumon gauche et une congestion marquée du cerveau et de la moelle. L'examen histologique du matériel montre dans la moelle lombaire des lésions intenses consistant en congestion des méninges avec pie-mérite et manchons périvasculaires ; lésions intenses de la corne antérieure avec manchons périvasculaires et neuronophagie (fig. 1). Atteinte manifeste des cellules pyramidales qui présentent différents degrés d'altération allant jusqu'à la chromatolyse et la pycnose complète. Des lésions du même type se rencontrent à tous les étages de la moelle, notamment dorsale et cervicale où elles sont un peu moins accusées que dans la moelle lombaire.

(2) Cf. P. LÉPINE, Encéphalomyélite enzootique des porcs, *Traité des Ultravirus des Maladies animales*, Paris, 1942, par C. LEVADITI, P. LÉPINE et J. VERGE, p. 815-825.



Dans l'encéphale il existe une congestion notable des méninges avec infiltration mono-lymphocytaire de la pie-mère et des septums. Dans le parenchyme cérébral on note des foyers d'encéphalite disséminés avec infiltrations de cellules rondes, les lésions les plus marquées étant rencontrées dans le cervelet où l'on note des altérations des cellules de Purkinje dont un certain nombre ont subi une neuronophagie totale.

*Passages* : à partir de cet animal la souche a été entretenue

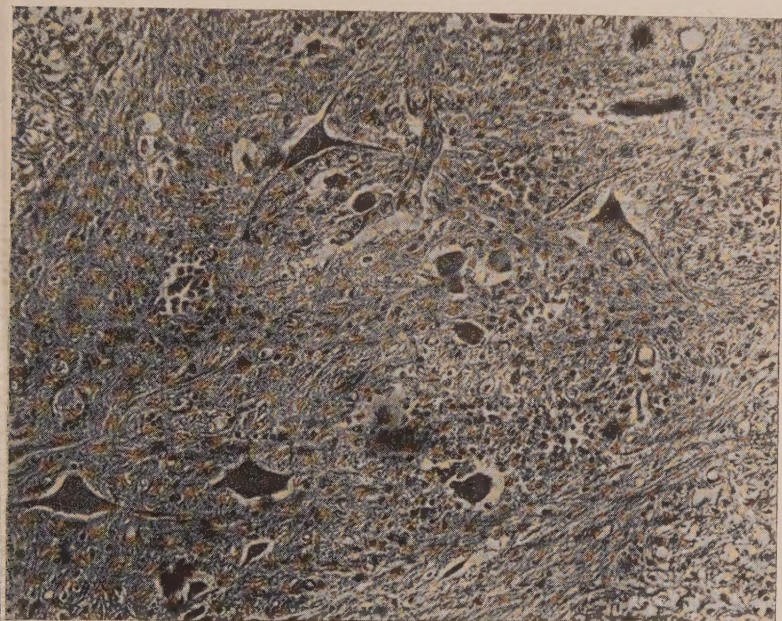


Fig. 1. — Paralyse de Madagascar. Porcelet n° 4. Lésions des cornes antérieures de la moelle : infiltration, manchons périvasculaires et neuronophagie.

sur porc. Le deuxième passage, effectué le 6 octobre sur le cochon n° 6, inoculé par voie intracérébrale, détermine chez cet animal une maladie typique (fig. 2 et 3) se terminant par la mort le douzième jour. Les passages suivants se comportent de même. Il a pu être également constaté que des animaux inoculés antérieurement (29 mars 1949) avec un matériel demeuré négatif lors des précédentes tentatives d'isolement et qui n'avaient pas contracté la maladie sont néanmoins restés sensibles au virus. C'est ainsi qu'un porc, n° 4, inoculé le 25 novembre avec le virus de passage est paralysé le huitième jour et succombe avec les symptômes typiques.



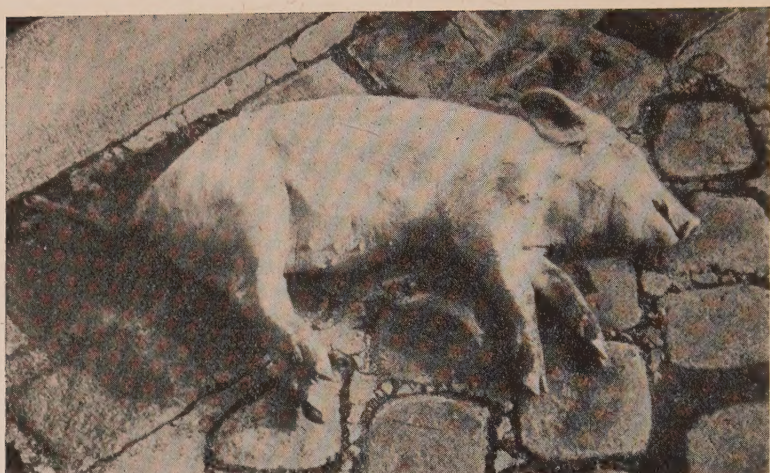


FIG. 2. — Paralyse de Madagascar, deuxième passage. Porcelet n° 6, quadriplégique et agonisant le 10 octobre 1949.

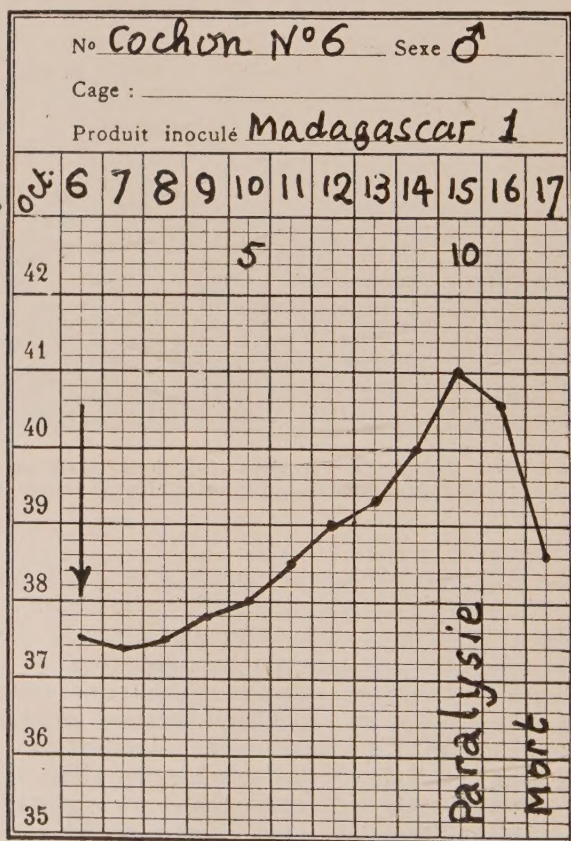


FIG. 3. — Isolement du virus de Madagascar, deuxième passage. Courbe de température du cochon n° 6.



Lors des passages d'entretien de la souche le virus a conservé les mêmes caractères : maladie fébrile survenant le septième jour après l'inoculation, paralysies apparaissant du neuvième au douzième jour ayant le caractère de paralysies flasques débutant habituellement par les pattes postérieures et se terminant par la mort de l'animal quadriplégique.

Les lésions histologiques consistent chez tous les animaux en infiltrations et en neuronophagie prédominant dans la colonne motrice de la substance grise médullaire et surtout accusées au niveau des renflements lombaires et cervicaux ainsi que dans le bulbe. Il existe néanmoins dans le cerveau et le cervelet un degré variable d'encéphalite diffuse confirmant qu'il s'agit bien d'une encéphalomyélite.

## II. — TRANSMISSION AU SANGLIER.

Ayant eu l'occasion de nous procurer de jeunes marcassins, nous avons essayé l'inoculation au sanglier (*Sus scrofa*, L.) d'une part du virus de la maladie de Teschen, d'autre part du virus isolé à Madagascar.

Le marcassin, n° 1, inoculé avec le virus de Teschen (souche tchécoslovaque) présente les premiers symptômes de la maladie le cinquième jour. Les jours suivants s'établit une paralysie qui se généralise rapidement et il meurt le huitième jour. L'examen de sa moelle a montré des lésions histologiques typiques d'encéphalite ainsi que de myélite dans le bulbe et la moelle cervicale. Dans l'ensemble le tableau a été identique à celui observé habituellement chez nos porcelets.

Un deuxième marcassin, n° 2, a été inoculé avec le virus de Madagascar. Il a reçu par voie intracérébrale 0,15 cm<sup>3</sup> de virus dilué à 10<sup>-2</sup> du quatrième passage du virus de Madagascar. Le sixième jour il présente une paraplégie du train postérieur (fig. 4) qui se généralise presque aussitôt. Il est sacrifié le même jour : à l'autopsie le cerveau est congestionné mais la culture de l'encéphale et de diverses portions du névraxe demeure négative. L'examen histopathologique montre des lésions diffuses d'encéphalite avec prédominance dans la protubérance où il existe une infiltration marquée, avec nodules inflammatoires, manchons périvasculaires et neuronophagie. Dans la moelle on observe une légère méningite généralisée et de petits foyers, prédominant dans les cornes antérieures de la moelle dorsale.

Il n'existe donc pas de différences notables ni du point de vue clinique, ni du point de vue anatomo-pathologique chez les deux sangliers dans les maladies déterminées soit par le virus authentique de Teschen, soit par le virus de Madagascar.

INOCULATION AU SINGE, A LA SOURIS ET AU SIGMODON. — Le virus de Madagascar a été inoculé (passage du cochon n° 6, sous forme d'une suspension de cerveau et de moelle, à un singe cynocéphale, n° 38) par voie intracérébrale. 4 jeunes sigmodons, 3 hamsters, 6 cobayes, 6 souris grises D.B.A., 2 lapins ont été inoculés par voie intracérébrale avec la même émulsion. Tous sont restés en bonne santé. Les lapins ont été saignés par la suite pour voir si leur sérum renfermait des anticorps virulicides pour la souche.

### III. — IMMUNITÉ CROISÉE AVEC LE VIRUS DE TESCHEN.

Au cours des passages effectués dans notre laboratoire avec le



FIG. 4. — Transmission du virus de Madagascar au sanglier : marcassin n° 2 au sixième jour de l'inoculation : paraplégie du train postérieur.

virus de Madagascar, le cochon n° 5, inoculé le 6 octobre 1949, a présenté une forme curable avec survie. Il s'agit d'un animal inoculé avec du matériel, prélevé à Tananarive le 23 septembre 1949, par M. Bück, qui nous est adressé avec les renseignements suivants :

Porc H. Large-white, cinq mois environ, provenant d'un élevage où ne sévit pas la paralysie contagieuse.

A reçu par la voie nasale et la voie buccale des émulsions de centres nerveux de porcs paralysés, à trois reprises, à six et dix jours d'intervalle, et la dernière fois, une petite quantité d'excréments par voie buccale. A présenté, quarante-huit heures après le dernier essai de contamination, de l'hyperthermie, de l'inappétence, une traînée rougeâtre au-dessus du groin, et trois jours après le début de l'hyper-



thermie, du vacillement du train postérieur qui s'est transformé en paralysie ; en même temps la température baissait ; l'animal mourait en hypothermie, la maladie ayant évolué en huit jours.

Le matériel reçu le 6 octobre est inoculé le même jour au

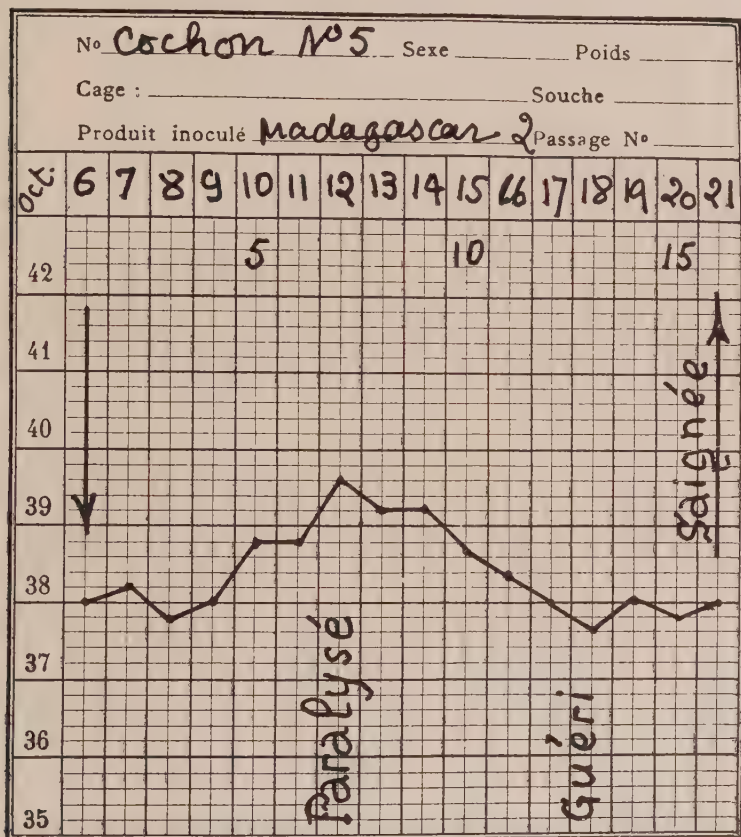


FIG. 5. — Paralysie de Madagascar, forme curable. Courbe de température du cochon n° 5 qui a fourni le sérum neutralisant.

cochon n° 5. Cet animal présente à la suite de l'inoculation une période fébrile de cinq jours, de l'amaigrissement et une parésie musculaire transitoire ; il a survécu, pour mourir finalement d'athrepsie le 6 décembre (fig. 5). L'animal a été saigné le 20 octobre et son sérum a servi à rechercher la présence d'anticorps virulicides à l'égard du virus de Madagascar et à l'égard du virus de Teschen.

Pour ce faire, une suspension de moelle et de cerveau de chacun des virus a été mise en contact à parties égales avec un volume égal de sérum du cochon n° 5, le virus étant dilué à  $10^{-1}$ . Le 21 décembre, après deux heures de contact du mélange à la température de  $37^{\circ}$ , deux cochons neufs, n°s 7 et 8, ont reçu l'un et l'autre  $1\text{ cm}^3$  du mélange de virus de Teschen et de sérum anti-Madagascar par voie intracérébrale. Les deux animaux ont survécu. L'un d'eux, le n° 7, n'a présenté aucun symptôme par la suite. L'autre, le n° 8, a présenté un épisode fébrile le 2 janvier 1950, avec tremblement, diminution du tonus et parésie de la patte gauche antérieure. Ces symptômes ont persisté quarante-huit heures et guéri sans laisser aucune trace. Un cochon témoin, n° 11, a présenté dans les délais normaux les symptômes caractéristiques de la maladie de Teschen.

Deux autres cochons, n°s 9 et 10, ont reçu de même par voie intracérébrale le mélange de virus de Madagascar et de sérum anti-Madagascar. Ils ont également survécu sans présenter aucune manifestation pathologique ni mouvement fébrile pendant toute la durée de trente jours de la période d'observation.

#### CONCLUSION.

La paralysie contagieuse apparue à Madagascar présente la symptomatologie clinique et les lésions anatomo-pathologiques de l'encéphalomyélite enzootique des porcs (maladie de Teschen). Après plusieurs essais infructueux d'isolement du virus au moyen de matériel qui nous a été adressé de Madagascar, essais dont l'échec doit être rapporté à l'auto-stérilisation du matériel infectieux, il a été possible d'isoler une souche du virus de la paralysie de Madagascar. Le virus a été entretenu depuis sur le porc qui s'est jusqu'ici montré, avec le sanglier, le seul animal sensible au virus. Le singe, le sigmodon, le hamster, la souris, le cobaye et le lapin sont réfractaires au virus inoculé par voie intracérébrale.

Les animaux convalescents de la paralysie de Madagascar présentent dans leur sérum des anticorps qui neutralisent à la fois le virus de Madagascar et le virus authentique de Teschen (souche tchécoslovaque).

Ces résultats permettent de rapporter au groupe de la maladie de Teschen la paralysie contagieuse des porcs observée depuis plusieurs années à Madagascar, bien qu'il n'existe, à notre connaissance, aucune relation épidémiologique directe entre le foyer connu centro-européen de la maladie de Teschen et la maladie observée à Madagascar.



# ÉTUDE DE L'ENLÈVEMENT PAR DIVERS AGENTS CHIMIQUES DU CUIVRE COMBINÉ AUX PROTÉINES

par FERNAND PASQUIER et MICHEL MACHEBOEUF.

(*Institut Pasteur.*)

Dans le but de séparer les protéines du sérum en utilisant la formation des combinaisons Cu-protéines, nous avons jugé utile de rechercher tout d'abord les méthodes qui permettent d'enlever quantitativement le cuivre combiné aux protéines sans dénaturer les protéines.

J. Lessiau, R. Cerf, M. Machebœuf [4] d'une part, J. Lessiau, G. Viollier et M. Machebœuf d'autre part, ont montré :

1° Que le traitement par le cuivre ne fait pas apparaître de biréfringence d'écoulement.

2° Que l'action du cyanure de potassium détache le cuivre des protéines, mais dénature partiellement les protéines.

Le cyanure de potassium est-il la seule substance capable d'arracher le cuivre combiné à des protéines ? On pouvait penser que toute substance capable de former avec le cuivre des complexes plus parfaits que ceux que le métal forme avec la protéine pouvait agir dans le même sens et l'on pouvait espérer trouver un réactif enlevant le cuivre tout en dénaturant moins la protéine.

Nous avons essayé une série de réactifs dans ce but, en nous guidant sur les propriétés des complexes que ces réactifs pouvaient former avec le cuivre et en particulier sur la diffusibilité à travers les membranes de dialyseurs. C'est ainsi que nous avons pu observer l'action très intéressante du sulfocyanure de potassium et plus encore celle du tryptophane. Mais avant d'en arriver là, de nombreux réactifs furent essayés sans obtenir des résultats aussi favorables. Quelques faits dignes d'être signalés ont été obtenus au cours de ces études préliminaires. On envisagera donc dans ce qui va suivre, non seulement les expériences sur le cyanure de potassium et le tryptophane, mais divers autres essais.

La protéine choisie pour nos essais fut la fraction « globu-

lines  $\gamma$  » du sérum de cheval préparée par relargage au sulfate d'ammonium (33 p. 100 de saturation), puis dialysée (1).

I. — ELIMINATION DU CUIVRE PAR DIALYSE  
CONTRE UNE SOLUTION DE SULFOCYANURE DE POTASSIUM.

Le sulfocyanure de potassium donne des complexes avec le cuivre, et nous avons pensé qu'il aurait peut-être, par rapport au cyanure, l'avantage de ne pas former avec les protéines des combinaisons stables et de les dénaturer moins.

Nos expériences ont porté sur divers échantillons d'une même solution de  $\gamma$ -globulines ( $c = 4,8$  p. 100) dont les pH (électrode de verre) s'échelonnaient entre 7,5 et 8,4. La variation du pH était obtenue par addition de soude (N/10). Après détermination du pII, la solution était additionnée d'un excès d'hydrate cuivrique (préparé suivant la technique de Peligot [4]) et le mélange était maintenu vingt-quatre heures dans une glacière.

Pour éliminer l'excès d'hydrate cuivrique, on a centrifugé. On a ensuite déterminé la teneur en cuivre de la solution cuivre- $\gamma$ -globulines, d'après la technique de D. Bertrand [5] après minéralisation. Un volume donné de cette solution (20 ml) est ensuite dialysé contre une solution de sulfocyanure de potassium (220 ml) à 3 p. 100 dont le pII est porté au voisinage de 8,5 par addition de soude N/10 (virage de la phénolphthaléine). Au cours de la dialyse, qui dura une semaine, la solution de sulfocyanure de potassium fut remplacée plusieurs fois. Le sac (en cellophane) contenant la protéine était lentement agité, grâce à un moteur électrique. Enfin, pour éliminer le sulfocyanure de potassium resté à l'intérieur du sac, on dialysa plusieurs jours contre de l'eau bidistillée en prenant la précaution de remplacer quotidiennement l'eau de dialyse. Dans chacune des solutions protéiques ainsi traitées, on a déterminé l'extrait sec et la teneur en cuivre. Malgré la grande sensibilité de la méthode, on n'a pas retrouvé de cuivre dans les solutions traitées. Or, nous opérons cette recherche sur des échantillons de protéines dont la masse était de l'ordre de 900 mg., et la méthode aurait permis de déceler sûrement 10  $\mu$ g. de cuivre. Avant la dialyse, les quantités de

(1) Rappelons que le sérum contient environ 1 milligramme de cuivre par litre. Cohn et coll. [8] ont pu isoler du sérum de cheval une cuproprotéine qui précipite avec les albumines lorsque l'on fractionne par relargage au sulfate d'ammonium. Les globulines contiennent cependant encore une très faible proportion du cuivre sérique (dans la globuline  $P_1$  de Green). Pour le sérum humain ce seraient au contraire les globulines qui contiendraient la majeure partie du cuivre sérique (Holmberg et Laurell [3]).



cuivre étaient de l'ordre de 125  $\mu\text{g}$ . (variation légère en fonction du pH).

L'enlèvement du cuivre par la dialyse contre sulfocyanure de potassium est donc très effectif (2).

Pour nous rendre compte des modifications subies par la molécule protéique au cours de ces diverses opérations, il a été procédé, sur l'un des échantillons, à des mesures de polarisation rotatoire et de biréfringence d'écoulement (3) après élimination du cuivre par dialyse ; la concentration protéique était, dans notre solution, après dialyse, 1,6 p. 100. Nous avons dilué le témoin de façon à obtenir une concentration égale. L'étude polarimétrique de ces deux solutions (tube polarimétrique : 10 cm.), réalisée à 20° C en utilisant deux couleurs (radiations jaune et verte de la lampe à vapeur de mercure :  $\lambda_j = 5.780 \text{ \AA}$  ;  $\lambda_v = 5.460 \text{ \AA}$ ) n'a pas révélé de différences significatives du pouvoir rotatoire. Nous donnons ci-dessous le tableau indiquant les résultats des dosages de cuivre et de mesures de polarisation rotatoire effectuées à pH 7,8 :

	AVANT DIALYSE	APRÈS DIALYSE
Quantité de Cu/g de protéines . .	440 $\mu\text{g}$ .	Non décelable.
Déviatiou rotatoire. . . . .	$j = - 0^{\circ}70$ $v = - 0^{\circ}90$	$j = - 0^{\circ}72$ $v = - 0^{\circ}95$

Les mesures de biréfringence d'écoulement indiquent tout au plus une faible proportion de gros agglomérats, mais on en trouve aussi bien dans le témoin que dans l'échantillon traité. Leur apparition n'est donc pas le fait de l'action du sulfocyanure de potassium. Les dimensions des agglomérats varient, pour le témoin, entre 4.200 et 5.400  $\text{\AA}$  (moyenne : 4.600  $\text{\AA}$ ) et pour l'échantillon traité entre 2.200 et 5.600  $\text{\AA}$  (moyenne : 3.900  $\text{\AA}$ ). La méthode au sulfocyanure de potassium permet donc d'éliminer le cuivre combiné artificiellement à une globuline. *A priori*, il n'était pas certain qu'elle permette d'arriver au même résultat pour une cuproprotéine naturelle. Pour cette raison, il nous a paru inté-

(2) Il est possible de procéder plus rapidement à l'élimination du cuivre en changeant de sac un jour après le début de la dialyse. L'explication de ce fait tient peut-être à ce que la globuline utilisée contient des lipides comme impuretés. Or, d'après Rosenbaum et Lavietes [6], les lipides du sérum donnent des complexes avec le sulfocyanure de potassium. Ce sont peut-être ces complexes qui colmatent les pores du sac.

(3) Les mesures de biréfringence d'écoulement ont été effectuées par M. Joly que nous tenons à remercier.

ressant d'appliquer la méthode à l'hémocyanine. En réalité, nous n'avons pas opéré sur de l'hémocyanine pure, mais sur du sang d'escargots (en période d'hivernage).

La dialyse a été réalisée dans les conditions précédentes : dans le sac, on avait mis 2 ml. de sang d'escargots. Les résultats des dosages d'azote et de cuivre effectués sur le témoin et, après dialyse, sur la solution contenue dans le sac, sont les suivants :

Masse de cuivre ramenée à 1 mg. d'azote :	
Avant dialyse . . . . .	2,7 µg.
Après dialyse . . . . .	0

Le sang d'escargots utilisé contenait 5 mg. d'azote par millilitre.

De cette étude, nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

1° *La dialyse contre sulfocyanure de potassium permet d'éliminer quantitativement le cuivre fixé à une protéine et le cuivre d'une cuproprotéine naturelle.* Les liaisons responsables de la fixation du cuivre sont peut-être de même nature dans les deux cas.

## II. — ELIMINATION DU CUIVRE PAR DIALYSE CONTRE SÉRUM DE CHEVAL.

La méthode précédente permet d'enlever quantitativement le cuivre combiné à une protéine. Mais cette méthode, qui ne semble pas dénaturer les protéines, est relativement lente. Nous avons pensé qu'il était peut-être possible d'enlever quantitativement et rapidement le cuivre combiné à une protéine du sérum par dialyse de cette protéine contre des solutions d'autres substances protidiques. Ces raisons nous ont incités à étudier le problème de l'élimination du cuivre combiné à une  $\gamma$ -globuline par dialyse contre sérum de cheval.

### A. ÉTUDE DE LA RÉPARTITION DU CUIVRE LORS DE L'ÉQUILIBRE. —

Les mesures ont porté sur 3 échantillons de  $\gamma$ -globulines ( $c = 2,55$  p. 100), de même volume (15 ml.), dont le pH était ajusté au voisinage de 8,5. La combinaison Cu- $\gamma$ -globulines était obtenue comme précédemment. Les dialyseurs ont été plongés respectivement dans les liquides suivants :

- 60 ml. de sérum non dialysé ;
- 60 ml. de sérum préalablement dialysé contre eau bidistillée ;
- Mélange de 60 ml. de sérum dialysé et de 3 ml. de sulfocyanure de potassium à 6 p. 100.

Le pH de ces solutions était porté au voisinage de 7,5 par addition de quelques gouttes d'une solution de soude N/1.



La dialyse, qui dura trois jours, se fit dans une glacière. La méthode de recherche du cuivre n'a pas pu déceler ce métal dans 5 ml. de l'un quelconque des échantillons. La majeure partie du cuivre était donc passée, dans tous les cas, à l'extérieur du sac. Pour déterminer la quantité de cuivre enlevée lors de l'équilibre à la combinaison Cu- $\gamma$ -globulines, il suffisait de doser le cuivre après dialyse dans la solution extérieure au dialyseur.

Nous avons trouvé que la quantité de cuivre contenue dans la solution (a) était environ 290  $\mu$ g. En tenant compte de la teneur normale en cuivre du sérum (60  $\mu$ g.), on trouve que la quantité de cuivre passée de l'intérieur à l'extérieur du sac est 230  $\mu$ g. environ. Le dosage de cuivre dans la  $\gamma$ -globuline cuivrée utilisée donnait 240  $\mu$ g. environ pour le contenu du sac. En prenant 7 p. 100 pour la concentration en protéines du sérum, on trouve 1/10 pour le rapport des masses de protéines situées respectivement à l'intérieur et à l'extérieur du sac. D'autre part, le rapport de la quantité de cuivre restée à l'intérieur du sac à la quantité de cuivre à l'extérieur est plus petit que 1/10. Il existe donc, dans le sérum de cheval, des substances qui, au voisinage de pH 7,5, fixent plus de cuivre que les  $\gamma$ -globulines du même sérum. Pour être certain qu'un phénomène d'oxydation différentielle n'a pas favorisé la fixation du cuivre par les protéines situées à l'extérieur du sac, nous avons dialysé une  $\gamma$ -globuline contenant du cuivre contre la même  $\gamma$ -globuline sans cuivre. La concentration en  $\gamma$ -globuline (2,1 p. 100) et le pH (8,5) avaient respectivement les mêmes valeurs à l'intérieur et à l'extérieur du sac. Au bout d'une semaine, l'équilibre n'était pas encore atteint, et la répartition du cuivre était encore en faveur de la protéine située à l'intérieur du sac. La répartition du cuivre s'effectuait donc normalement et aucun phénomène connexe ne venait troubler le processus primaire lorsque les protéines étaient les mêmes de part et d'autre de la membrane.

B. RÔLE ÉVENTUEL D'UN AGENT TRANSPORTEUR. — On pouvait se demander si, dans les expériences précédentes, le passage du cuivre de la protéine située à l'intérieur du sac jusqu'au sérum extérieur au sac n'était pas favorisé par une substance inconnue jouant en quelque sorte le rôle de transporteur. A titre d'essais préliminaires sur ce problème, nous avons repris les expériences de dialyse contre sérum dialysé ou non, en étudiant les vitesses de passage du cuivre (toutes les conditions expérimentales, en particulier la concentration protéique et le pH, étaient identiques dans les deux cas). Nous pensions ainsi déceler une différence entre le sérum dialysé et le sérum non dialysé, car la dialyse pouvait avoir fait baisser la teneur en transporteurs inconnus. Effectivement, la vitesse de passage du cuivre fut plus grande dans le cas du sérum non dialysé.

Une question se posait donc : quelle est la substance présente dans le sérum, mais éliminable par la dialyse, qui favorise le transport du cuivre à travers le dialyseur depuis la  $\gamma$ -globuline jusqu'au sérum ? Nous avons essayé l'action de diverses substances diffusibles connues, présentes dans le sérum : chlorure de sodium, bicarbonate de sodium, phosphate disodique, urée, et nous avons comparé leur action à celle d'un dialysat de sérum. A titre de témoin, un échantillon fut dialysé contre une solution de sulfo-cyanure de potassium.

Six échantillons de 3 ml. de  $\gamma$ -globulines cuivrées, contenant chacun 2,55 p. 100 de globulines et 57  $\mu$ g. de cuivre (pH 8,5), furent placés dans de petits dialyseurs qui furent plongés chacun dans 100 ml. de l'une des solutions. Les solutions salines étaient toutes équimoléculaires (0,2 M). Le dialysat de sérum avait une teneur en extrait sec de 0,2 p. 100 environ. Le cuivre fut dosé dans le contenu des dialyseurs après quarante-huit heures de dialyse seulement.

Les résultats sont donnés dans le tableau ci-contre.

SOLUTION DIALYSANTE	NaCl	CO <sub>3</sub> HNa	PO <sub>4</sub> HNa <sub>2</sub>	URÉE	DIALYSAT de sérum	SCNK
Teneur en Cu du contenu du sac avant dialyse . . . . .			57 $\mu$ g.			
Après dialyse. . . . .	50 $\mu$ g.	28 $\mu$ g.	41 $\mu$ g.	28 $\mu$ g.	15 $\mu$ g.	27 $\mu$ g.

Un premier fait intéressant est que le bicarbonate de sodium enlève autant de cuivre en quarante-huit heures que le sulfo-cyanure. L'urée a une action du même ordre, mais, fait très intéressant, le dialysat de sérum, qui pourtant est moins riche en substances dissoutes que les autres solutions, provoque un passage beaucoup plus rapide de cuivre.

Cette activité particulière au dialysat de sérum ne peut évidemment pas s'expliquer par la présence des sels qu'il contient (NaCl, phosphates, carbonates). Nous nous sommes donc demandé si les amino-acides présents en petites quantités dans le dialysat de sérum ne pouvaient pas jouer un rôle important.

### III. — ELIMINATION DU CUIVRE PAR DIALYSE CONTRE DES SOLUTIONS D'ACIDES AMINÉS.

Notre premier essai porta sur un mélange d'amino-acides naturels obtenus par hydrolyse acide des protéines totales d'un sérum de cheval.



Pour préparer cet hydrolysât, du sérum fut d'abord soumis à une dialyse prolongée contre de l'eau distillée afin d'éliminer les substances diffusibles. Le liquide fut ensuite additionné d'acide chlorhydrique jusqu'à concentration 5M, puis soumis à l'ébullition pendant quarante-huit heures. On chassa l'acide chlorhydrique autant que possible par ébullition sous vide, puis on ajouta de l'eau et de la soude, de façon à obtenir un liquide de pH 8,5. On agita avec un peu de noir animal, puis on filtra. Dans ces conditions, évidemment, notre liquide ne contenait pas de tryptophane, et la majeure partie de la cystine et de la tyrosine avait été éliminée. L'action de ces 3 amino-acides sera étudiée d'autre part.

La solution ainsi obtenue contenait 0,15 p. 100 d'azote. Nous la désignerons par le terme « hydrolysât ». C'est dans 100 ml. de cet hydrolysât que fut plongé un dialyseur contenant 4 ml. d'une solution de  $\gamma$ -globulines cuivrées à pH 8,5. La quantité de cuivre contenue dans le dialyseur au début de l'expérience était 70 microgrammes. On laissa le dialyseur baigner dans l'hydrolysât pendant deux heures seulement, puis on dosa le cuivre dans son contenu. Le résultat fut 20 microgrammes. Le mélange d'amino-acides qui constitue l'hydrolysât est donc capable d'enlever très bien le cuivre combiné aux globulines. Le phénomène méritait une étude plus détaillée, et nous avons essayé isolément divers amino-acides. Dès notre premier essai, un fait très intéressant est apparu : le tryptophane a une activité particulièrement considérable (4). Voici comme exemple les chiffres obtenus dans une expérience où le tryptophane fut comparé à la proline et à la tyrosine.

La quantité de cuivre combiné à des  $\gamma$ -globulines présentes dans les dialyseurs au début de l'expérience était 70 microgrammes, la concentration en globulines était 2,8 p. 100 (pH 8,5). Les solutions d'amino-acides dans lesquelles plongeaient les dialyseurs étaient

AMINO-ACIDE extérieur au sac	TRYPTOPHANE	PROLINE	TYROSINE (1)
Cuivre resté dans les sacs . . . . .	12 microg.	50	54

(1) La proline et la tyrosine ont été choisies pour cette expérience par suite de certaines ressemblances structurales avec le tryptophane. Cette expérience constitue donc une amorce d'une étude sur le mode de réaction du tryptophane avec le cuivre.

(4) L'activité si grande du tryptophane comme agent d'enlèvement du cuivre laisse penser que cet amino-acide donne avec le métal des combinaisons stables.

très diluées : M/400. Les sacs trempèrent pendant deux heures seulement dans les solutions d'amino-acides, puis ils furent plongés pendant vingt-quatre heures dans de l'eau distillée. On dosa enfin le cuivre resté dans chacun des sacs.

De l'étude précédente, nous pouvons conclure :

1° Des amino-acides peuvent enlever quantitativement le cuivre combiné à une protéine. Cette élimination est beaucoup plus rapide qu'avec le sulfocyanure de potassium.

2° Parmi ces acides aminés, le tryptophane a une activité particulièrement grande.

3° Il est possible que le tryptophane inclus dans les molécules protéiques soit l'un des points d'attache du cuivre aux protéines. Ceci contribuerait, en particulier, à expliquer que les protéines fixent le cuivre en milieu acide, neutre ou peu alcalin, c'est-à-dire dans des conditions où les fonctions amides de la chaîne peptidique ne semblent pas intervenir (5).

#### IV. — DÉTERMINATION DES FONCTIONS CHIMIQUES DU TRYPTOPHANE RESPONSABLE DE SON ACTIVITÉ PARTICULIÈRE.

Nous pouvons maintenant essayer de déterminer les liaisons responsables de la fixation du cuivre par le tryptophane. Nous savons que l'hydrogène lié à l'azote du noyau indol a une grande mobilité. Mais la réactivité particulière du tryptophane a peut-être d'autres causes. C'est pourquoi nous croyons intéressant de comparer les résultats de dialyse contre le tryptophane, d'une part avec les résultats de dialyse contre indol et acide indol-acétique d'autre part. Les résultats sont donnés par le tableau suivant (dialyse pendant deux heures seulement) :

CORPS	TRYPTOPHANE	INDOL	ACIDE indolacétique
Teneur en Cu avant hydrolyse (contenu du sac). .		70 µg	
Teneur en Cu après dialyse (contenu du sac) . . . .	16 µg.	56 µg.	60 µg.

Il ne semble pas que cette activité particulière du tryptophane doive être attribuée à un effet induit, car il se ferait sentir égale-

(5) Pour étayer cette hypothèse, signalons que le glutathion, le biuret, l'acide lactique et l'urée (substances possédant certaines des fonctions que l'on pouvait incriminer dans la fixation du cuivre par les protéines), sont loin d'enlever le cuivre par dialyse aussi bien que le tryptophane.



ment dans l'acide indol-acétique. On peut vraisemblablement supposer que la réactivité particulière du tryptophane est due à un effet de champ. Le groupement  $\text{NH}_2$  agirait directement sur le groupement  $\text{NH}$  du noyau indol pour augmenter la mobilité de l'hydrogène fixé à cet azote.

Nous avons déjà vu, d'autre part, que la tyrosine et la proline ont des activités considérablement moindres que celles du tryptophane. Nous pouvons donc penser que le rôle du tryptophane est dû à son groupement imine appartenant à un cycle pentagonal porteur de liaisons éthyléniques et voisin d'un groupement  $\alpha$ -aminé.

#### RÉSUMÉ.

Les protéines combinées à du cuivre en milieu acide, neutre ou peu alcalin, peuvent être débarrassées du métal, sans dénaturation sensible, en les soumettant à la dialyse contre une solution diluée de l'une des substances suivantes : sulfocyanures alcalins, amino-acides et, tout particulièrement, tryptophane.

Le sérum sanguin contient des fractions protéiques plus affines pour le cuivre que ses  $\gamma$ -globulines, et il contient également de petites quantités de transporteurs, si bien que la dialyse contre du sérum entier est un excellent moyen pour décuvrer une protéine que l'on avait préalablement chargée de cuivre.

Ces faits s'appliquent non seulement aux cuproprotéines artificielles mais aussi à l'hémocyanine.

Le rôle particulièrement important du tryptophane comme agent d'enlèvement du cuivre laisse penser qu'il donne avec ce métal des combinaisons particulièrement stables. Nous avons recherché quelles étaient les fonctions chimiques du tryptophane susceptibles d'être responsables de cette activité.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] LESSIAU (J.), CERF (R.) et MACHEBOEUF (M.). *Ces Annales*, 1948, **74**, 341. — LESSIAU (J.), VIOLLIER (G.) et MACHEBOEUF (M.). *Helv. Physiol. Acta*, 1948, **C 25**, C 28, 6.
- [2] KEILIN et MANN. *Biochem. Z.*, 1927, **187**, 255.
- [3] HOLMBERG et LAURELL. *Acta Chem. Scand.*, 1947, **1**, 944.
- [4] PELIGOT. *C. R. Acad. Sci.*, 1867, **53**, 213.
- [5] BERTRAND (D.). *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1943, **25**, 43.
- [6] ROSENBAUM (J. D.) et LAVIETES (Paul H.). *J. Biol. Chem.*, 1939, **131**, 663-674.
- [7] TAUBER (H.). *J. Am. Chem. Soc.*, 1944, **66**, 310.
- [8] COHN (E. J.), MC MEEKIN (T. L.), ONCELY (J. L.), NEWELL (J. M.) et HUGHES (W. L.). *J. Am. Chem. Soc.*, 1940, **62**, 3386.

## UN NOUVEAU TEST DE PHYSIO-PATHOLOGIE : LA FICHE RÉTICULO-ENDOTHÉLIALE (1)

par G. SANDOR et J.-CH. WEILL-FAGE (\*).

(Institut Pasteur. Service de Chimie physique.)

Nous avons souligné dans plusieurs communications l'importance immunologique des euglobulines sériques et montré la remarquable analogie qui existe de ce point de vue entre le sérum humain et le sérum de cheval [1]. On pouvait prévoir que les substances qui sont importantes du point de vue immunologique le seraient encore du point de vue de la pathologie générale. Comme la méthode de dialyse directe du sérum permet une étude quantitative commode des euglobulines, nous avons tenté d'en déduire une technique grâce à laquelle un test physio-pathologique véritable puisse être obtenu. Dans une communication préliminaire nous avons montré qu'il pourrait bien en être ainsi pour les diagrammes de solubilité des protéides sériques avec le paramètre : pH une fois que les limites des variations physiologiques furent déterminées [2]. Depuis, la technique a été perfectionnée sur certains points et, d'autre part, après l'étude complète de 43 sujets normaux et pathologiques nous avons pu tenter d'établir les limites des variations physiologiques. Les données, convenablement interprétées, apparaissent alors d'une constance remarquable dans l'état normal et, partant, leurs modifications caractérisent certains états pathologiques.

### DESCRIPTION DES TECHNIQUES.

Ces techniques ont été déjà publiées [2]. Pourtant, nous allons les reproduire intégralement parce qu'elles ont été modifiées sur certains points et aussi parce que de leur observation rigoureuse dépend le succès de l'opération. Rappelons qu'il s'agit de dresser les courbes représentatives des variations de la solubilité des

(1) Certains des sérums étudiés nous ont été remis par MM. les Drs Catham, médecin des Hôpitaux de Paris ; Frumuzan, Lévy, Martin, directeur de l'Hôpital Pasteur ; Sureau et Walther, médecin chef de l'Hôpital Rothschild. Nous tenons à les remercier ici.

(\*) Société Française de Microbiologie, séance du 4 mai 1950.



protéides sériques en fonction du pH et, pour cela, il faut amener le sérum par dialyse à une force ionique suffisamment faible, cependant déterminée, et à un pH de départ légèrement alcalin.

Le sérum est séparé du caillot par centrifugation quelques heures après la saignée et traité dans les cinq jours qui suivent. 5 cm<sup>3</sup> de sérum au minimum sont mis à dialyser sous pression contre un excès (2 litres en général) d'une solution de phosphate tampon de Clark et Lubbs M/75, de pH 7,6 à 7,7. Au bout de cinq heures de dialyse environ, le dialysat est remplacé par le même phosphate tampon dilué de moitié (donc M/150) et la dialyse est continuée sous une couche épaisse de toluène, de préférence à la glacière, pendant quarante-huit heures. Lors de cette dialyse préliminaire un précipité se forme, que nous avons appelé euglobuline I<sub>1</sub>. Il est recueilli par centrifugation, lavé une première fois avec 1 à 2 cm<sup>3</sup> du dialysat (avec lesquels on a rincé au préalable le dialyseur) et ces premières eaux de lavage sont ajoutées aux eaux mères. Puis le précipité d'euglobuline I<sub>1</sub> est lavé une seconde fois dans les mêmes conditions ; enfin, son taux est fixé par dosage d'azote. Pour toute précaution, le volume des eaux mères est déterminé par pesées (en admettant que la densité du sérum soit d'environ 1,03), mais une dilution de 10 à 20 p. 100 pendant la dialyse ne modifie pas sensiblement les résultats et une telle dilution est rarement atteinte si on dialyse sous une pression de quelques centimètres de mercure. Puis, le sérum est dilué dans l'eau distillée exactement au quart de son volume de départ. Toutes les mesures de volume sont effectuées par pesée au trébuchet à 5 mg. près. Quinze à vingt minutes après la dilution du sérum on centrifuge pendant deux à trois minutes à 6.000 tours par minute, le sérum est décanté dans le récipient primitif taré et le tube à centrifuger contenant le précipité est renversé sur du papier filtre propre et laissé égoutter pendant quelques minutes. Les précipités collent toujours aux parois de verre, aussi après avoir laissé égoutter, on essuie la moitié supérieure du tube à centrifuger avec un linge. Enfin, on dissout le précipité de préférence dans l'eau physiologique bicarbonatée à 1 p. 1.000, dans laquelle il se dissout le mieux et on le transvase dans un matras de Kjeldahl pour le dosage d'azote. Des eaux mères on prélève la quantité nécessaire pour la mesure du pH, puis on les pèse à nouveau pour déterminer leur volume. Une quantité aliquote d'acide chlorhydrique N/20 est ajoutée, à partir d'une burette au 1/50 de centimètre cube, lentement pendant que la solution est fortement agitée (sans cependant provoquer de mousse). On attend au moins dix minutes, puis on recommence l'opération. On continue à ajouter de l'acide chlorhydrique N/20 par fractions séparées aussi longtemps que des précipités se forment en quantités sensibles et on attend toujours

au moins dix minutes après chaque acidification nouvelle avant d'éliminer le précipité. Les volumes d'acide chlorhydrique N/20 sont calculés de manière que le pH, en général 7,5 à 7,6 au départ, soit amené à 4,9 environ, limite de précipitation des euglobulines sériques, dans 9 à 10 acidifications successives. On arrivera à ce résultat en prenant pour les deux premiers points des volumes d'acide chlorhydrique respectivement égaux à 1,15 et 1,05 p. 100 environ du volume total du sérum dilué, puis en continuant d'ajouter cinq fois 0,9 à 0,8 p. 100 du volume d'acide chlorhydrique et en terminant enfin par deux à trois fois avec 1 à 1,15 p. 100 du volume. On reprendra le pH des eaux mères toutes les deux acidifications. Chaque précipité successif est séparé par centrifugation et son taux déterminé séparément par dosage d'azote.

Les dosages d'azote sont faits dans l'appareil de Parnass et Wagner et l'ammoniaque est titré par des solutions N/20 lorsque le volume du sérum dépasse 12 à 13 cm<sup>3</sup>, et par des solutions N/40 lorsqu'il en est inférieur. On mesure les pH potentiométriquement par l'électrode de verre, puis, les volumes d'acide ajoutés étant exactement connus, on trace la courbe de titrage sur laquelle on lit les pH des points manquants.

Connaissant les volumes d'acide ajoutés et les volumes successifs d'eaux mères restantes, celles-ci déterminées par pesée, on calculera exactement les volumes restants du sérum et, en divisant par ces volumes les poids des précipités successivement obtenus, on calculera les poids de précipités par centimètre cube de sérum.

Pour pouvoir comparer les données et aussi pour éliminer les facteurs de l'hydratation plasmatique qui ne nous intéressent que secondairement, on prend la somme des précipités obtenus pour un pH donné pour 100 du poids de la somme totale des précipités. Les poids des sommes successives de précipités ainsi exprimés en taux sont portés en ordonnées, les pH étant portés en abscisses.

Dans le calcul des poids des précipités, il s'impose une correction du fait des eaux mères emprisonnées, celles-ci étant relativement riches en protéides. Les résultats les plus raisonnables sont obtenus en admettant que les eaux mères laissent à chaque fois environ 0,5 mg. de protéides avec les précipités et cette quantité est retranchée des poids de précipités directement obtenus. Pour transformer l'azote en poids de protéides on multiplie par 6,4.

Par rapport à la technique primitivement publiée [2], nous avons modifié surtout la durée qui sépare chaque acidification nouvelle de l'obtention des précipités par centrifugation. En effet, dans nos premières expériences, nous n'avons attendu que cinq



minutes. Or, dans ces conditions, dans certains sérums surtout, des précipités secondaires se forment au-dessus de pH 7 et il faut attendre au moins dix minutes pour qu'il n'en soit pas ainsi.

Une objection a pu être formulée contre notre technique. La vitesse de dialyse pouvant varier, il n'est pas sûr qu'un équilibre soit atteint dans tous les cas dans l'échange ionique. Pourtant, dans notre première communication, nous avons montré déjà qu'il est fort probable qu'un tel équilibre soit atteint si on emploie des dialyseurs de perméabilité convenable [2]. D'autre part, la constance remarquable des résultats est aussi une preuve indi-

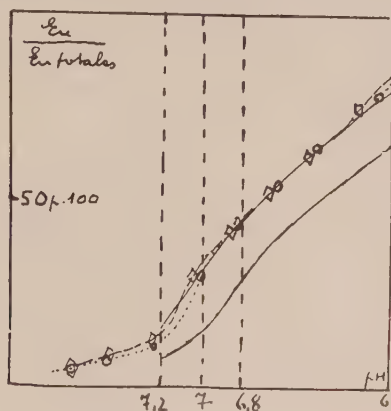


FIG. 1. — Diagramme de solubilité des protéides d'un sérum humain. En traits pleins sont indiquées les limites des variations physiologiques.  $\diamond$  --- =  $\text{PO}_4$  --- M/450;  $\circ$  --- =  $\text{PO}_4$  --- M/600.

recte en faveur du bien-fondé de cette conclusion. Enfin, nous avons vérifié directement que si on modifie exprès, d'une manière relativement considérable, la force ionique du départ, les quantités de protéides précipités varient appréciablement, il est vrai, mais les taux de précipitation exprimés en p. 100 du précipité total restent sensiblement constants. Pour illustrer ce fait, nous reproduisons ci-après deux diagrammes obtenus avec le même sérum dialysé dans les mêmes conditions (fig. 1). Le premier diagramme a été obtenu avec une fraction aliquote de ce sérum dilué au quart dans les conditions habituelles, tandis qu'à une autre fraction aliquote nous avons ajouté au préalable un volume du dialysat tel que la molarité en ions phosphate soit M/450 au lieu de M/600. Quoique le taux des euglobulines totales atteigne 7,5 p. 1.000 dans le premier cas et ne soit que de 6,8 p. 1.000 dans le second, les deux diagrammes sont sensiblement comparables.

## RÉSULTATS OBTENUS.

Le diagramme de solubilité, le taux du précipité formé lors de la dialyse préliminaire (euglobuline  $I_1$ ) et celui des euglobulines totales constituent trois données indépendantes et il est intéressant de considérer encore le rapport du taux de l'euglobuline  $I_1$  sur celui des euglobulines totales. Les limites des variations physiologiques s'établissent pour ces quatre données comme suit :

1° *Diagramme.* — pH 7,2 : 8 à 16 p. 100 ; pH 7 : 15 à 30 p. 100 ; pH 6,6 : 40 à 55 p. 100 et pH 6 : 60 à 80 p. 100 (ce qui se lit : à pH 7,2 au moins 8 au maximum 16 p. 100 des euglobulines doivent précipiter, et ainsi de suite).

2° *Rapport : euglobuline  $I_1$  sur euglobulines totales p. 100.* —

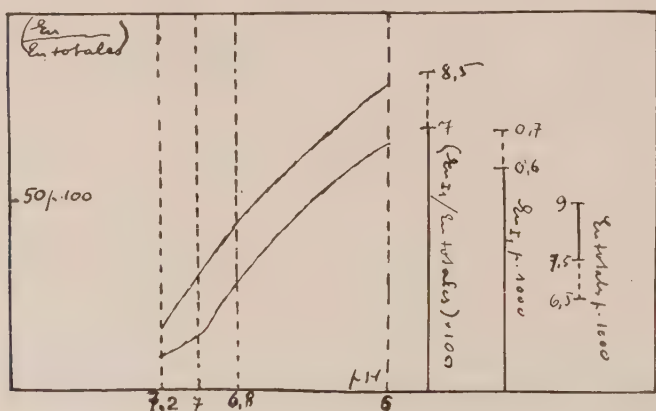


FIG. 1 a. — Fiche réticulo-endothéliale en blanc. Sur le diagramme en traits pleins sont indiqués les limites des variations physiologiques.

$\leq 7$  p. 100, entre 7 et 8,5 p. 100 se situent les valeurs d'interprétation douteuse.

3° *Taux sérique de l'euglobuline  $I_1$ .* —  $\leq 0,6$  p. 1.000. Entre 0,6 et 0,7 p. 1.000 se placent les taux d'interprétation douteuse.

4° *Taux des euglobulines totales.* — 7,5 à 9 p. 1.000. Entre 6,5 et 7,5 p. 1.000 la conclusion reste incertaine.

En faisant figurer ces quatre données sur du papier millimétré, nous établissons une fiche en blanc sur laquelle peuvent être portées les caractéristiques concernant un sujet donné. Comme nous le voyons, le diagramme « normal » figure une bandelette sur la surface (euglobulines/euglobulines totales).  $100 \equiv f$  (pH). D'autre part, les courbes sont fortement accidentées [2]. Aussi il ne faudrait pas s'en tenir rigoureusement aux données numériques, mais interpréter plutôt l'ensemble de l'impression que



donne le diagramme d'un sujet donné par rapport à la bandelette normale. A titre d'exemple, nous donnons le diagramme de *Dul* (épiphysite vertébrale), lequel, tout en dépassant la normalité par endroits, reste dans son ensemble parfaitement normal (fig. 2). Par contre, *Lob* (saturnisme), dont le diagramme ne dévie de la normalité que dans une région relativement alcaline, présente un cas franchement pathologique (fig. 2).

Précédemment nous avons montré que la courbe peut être interprétée par la superposition des domaines de précipitation de 4 ou 5 protéides distincts [2]. Du fait déjà que les domaines de précipitation se recoupent fortement, il serait difficile de

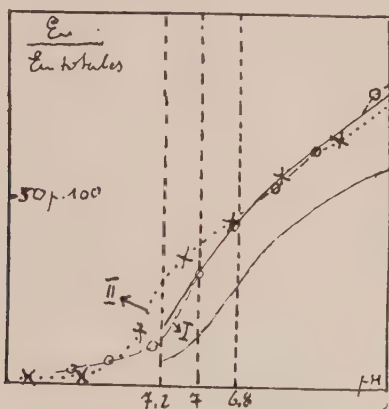


FIG. 2. — I, *Dul*... (épiphysite vertébrale); II, *Lob*... (saturnisme).

rendre compte des variations quantitatives de chaque fraction prise isolément. Par contre, on peut bien tenir compte dans une certaine mesure de la balance globale entre euglobulines alcalines et euglobulines acides. Si nous considérons, par exemple, les déplacements du diagramme vers la région acide, ils pourraient être dus, *a priori*, soit à une diminution de la valeur absolue des euglobulines alcalines, soit à une augmentation de la quantité des euglobulines acides. Mais, dans le premier cas, le diagramme exprimé en taux relatifs accusera un départ de l'axe des abscisses dans une région relativement acide, tandis que, dans le deuxième cas, ce départ se situera dans un domaine plus alcalin. Aussi nous traçons sur la fiche en blanc les ordonnées correspondantes aux pH : 7,2, 7 et 6,8, et considérons comme un départ « normal » celui qui se produit entre pH 7 et 7,2. Ceci nous permettra, nous le voyons, de tracer des différences entre les diagrammes déplacés vers la région acide et nous allons en apporter plus loin un exemple caractéristique.

MODIFICATIONS DES DIAGRAMMES  
DANS LES DIVERS ÉTATS PATHOLOGIQUES.

Deux types principaux peuvent être observés. Le diagramme d'un malade peut être déplacé soit vers la région alcaline, soit vers la région acide.

Certains convalescents de fièvre typhoïde présentent les exem-

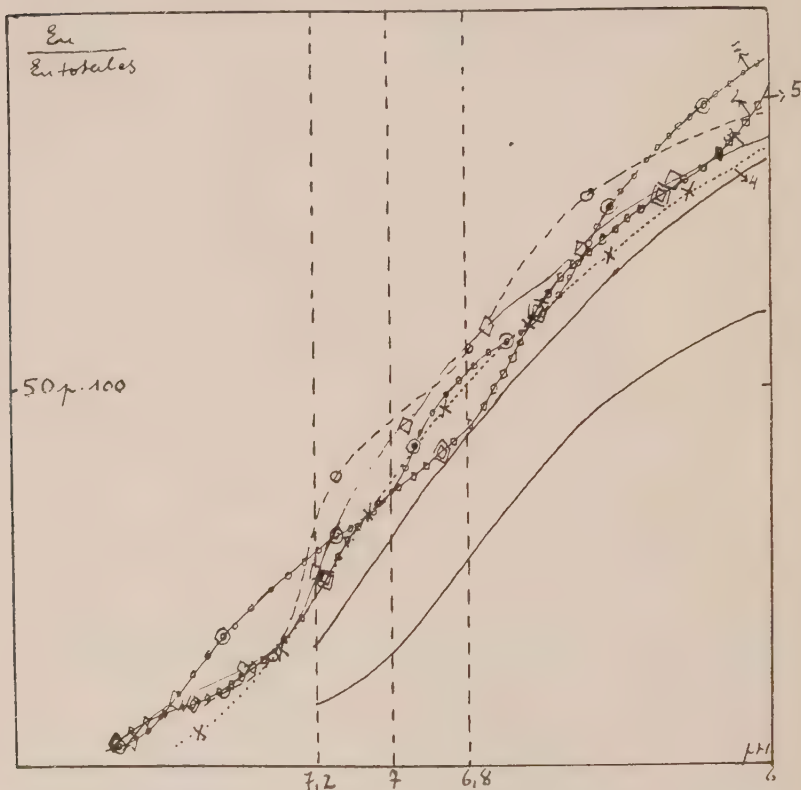


FIG. 3. — Diagrammes en cas d'hyperplasie : 1, myxœdème; 2, convalescent de fièvre typhoïde; 3, convalescent de fièvre typhoïde; 4, glomérulonéphrite évolutive; 5, maladie d'Osler.

ples les plus marqués du déplacement du diagramme vers l'alcalinité (fig. 3). L'unique cas de myxœdème étudié possède un diagramme très proche et il en est de même pour le sérum d'un sujet atteint de maladie d'Osler (fig. 3). Une glomérulonéphrite subchronique évolutive (Ren..., fig. 3) accuse encore un déplacement marqué vers la région alcaline. L'« alcalinisation »



quoique indiscutable, est cependant bien moins intense dans le cas du saturnisme déjà mentionné (fig. 2) et dans un cas d'anémie avec plasmocytose à la ponction sternale.

Quant aux déplacements du diagramme vers la région acide, les cas extrêmes nous ont été fournis par la phase terminale de

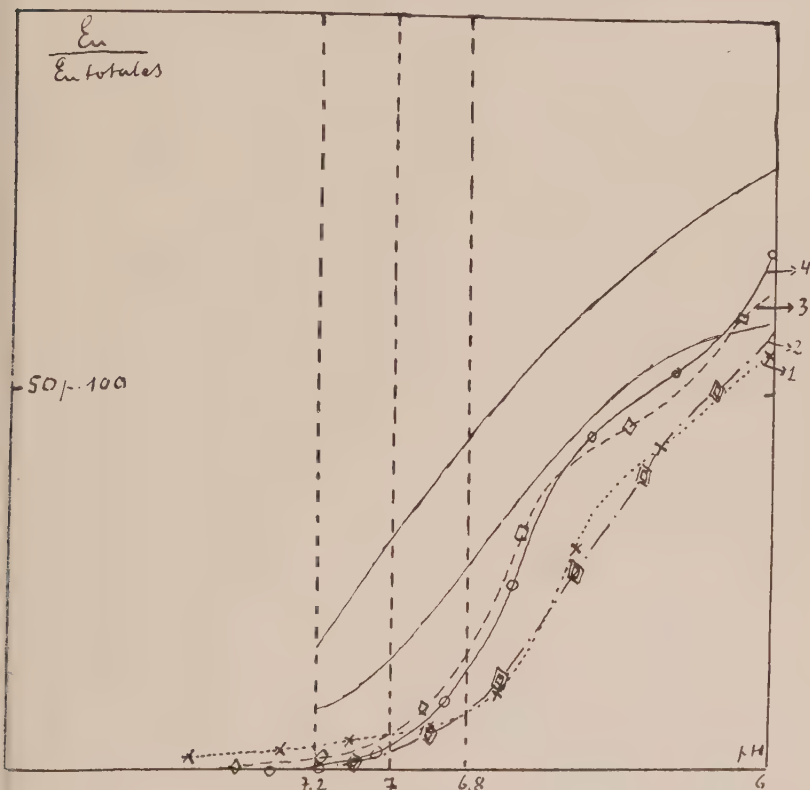


FIG. 4. — Diagrammes en cas d'aplasie ou de blocage : 1, infarctus du myocarde; 2, néphrite, phase terminale; 3, néphrite, phase terminale; 4, infarctus du myocarde.

la néphrite chronique hypertensive et azotémique (Cou... et Com..., fig. 4) et par deux cas d'infarctus du myocarde étudiés (Aur... et Lec..., fig. 4). Ces quatre diagrammes sont quasi identiques et — fait capital — accusent tous les quatre un départ franc de l'axe des abscisses pour un pH relativement très acide, au-dessous de pH 6,8. Une méningite tuberculeuse nous donnera un autre exemple d'« acidification » du diagramme, moins marqué mais non moins significatif (fig. 5). Le départ franc de

l'axe des abscisses se produit ici entre pH 6,8 et pH 7, donc ce départ, lui aussi, est encore sensiblement déplacé vers la région acide.

L'autre type d' « acidification » dont nous avons parlé est pré-

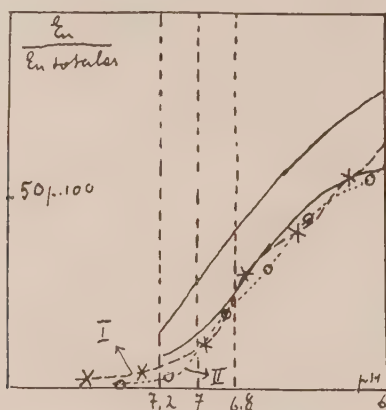


FIG. 5. — I, *Let...* (méningite tuberculeuse); II, *Gro...* (crise aiguë de goutte).

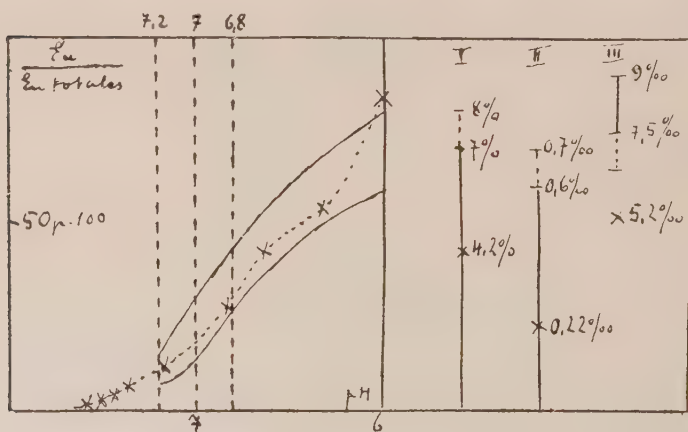


FIG. 6. — Fiche réticulo-endothéliale d'*Abd...* (pneumonie troisième jour.) I, euglobuline  $I_1$ /euglobulines totales; II, taux de l'euglobuline  $I_1$ ; III, taux des euglobulines totales.

senté par *Gro...*, sujet atteint d'une crise aiguë de goutte (fig. 5). La courbe, ici, tout en restant constamment au-dessous de la normale, suit fidèlement la ligne tracée par la limite inférieure de celle-ci. En particulier, le départ franc de l'axe des abscisses se produit au-dessus de pH 7, donc ce départ peut être considéré

comme normal. D'autre part, nous avons présentement un taux d'euglobulines totales de 8,9 p. 1.000, limite supérieure du taux normal. Nous pourrions penser, dès lors, que la modification consiste plus en une augmentation du taux des euglobulines acides que dans une diminution de celui des euglobulines alcalines.

Mentionnons, enfin, que dans l'unique cas de pneumonie étudié (troisième jour), le diagramme était normal (fig. 6). La seule anomalie manifeste est un effondrement du taux des euglobulines totales (5,2 au lieu de 7,5 à 9 p. 1.000), peut-être en raison de la dilution sérique, suite de l'extrême phlegmasie.

#### TAUX DE L'EUGLOBULINE $I_1$ ET DES EUGLOBULINES TOTALES.

Le taux de l'euglobuline  $I_1$  est à considérer en second lieu. On aurait pu croire que, rentrant dans le domaine des euglobulines « alcalines », son taux va augmenter simplement dans les cas de déplacement des diagrammes vers la région alcaline. Tout au contraire, le cas extrême a été celui d'Aur..., sujet atteint d'infarctus du myocarde. Nous avons pu étudier le sérum de ce sujet à trois reprises successives, quelques jours après le début de l'infarctus, trois semaines plus tard et, enfin, trois mois après lorsqu'il revint à l'hôpital avec un deuxième infarctus. Or, alors que son diagramme restait toujours très fortement déplacé vers l'acidité, les trois taux d'euglobulines  $I_1$  trouvés ont été : 2,16, 2,23 et 2,35 p. 1.000, c'est-à-dire environ cinq fois le taux normal. D'autre part, il est tout aussi certain que les modifications diagrammatiques et celles du taux de l'euglobuline  $I_1$  dénotent deux processus pathologiques totalement distincts. En effet, chez Lec..., l'autre sujet atteint d'infarctus du myocarde étudié, nous retrouvons encore l'extrême déplacement du diagramme vers la région acide alors que le taux de l'euglobuline  $I_1$  est présentement normal : 0,52 p. 1.000.

Dans le tableau ci-après nous avons réuni quelques taux de l'euglobuline  $I_1$  (tableau I). Nous avons mis sur le même tableau les valeurs du rapport : euglobuline  $I_1$ /euglobulines totales. Il est intéressant de remarquer l'augmentation quasi constante du taux de l'euglobuline  $I_1$  dans la fièvre typhoïde. Sur 10 cas étudiés, une seule fois ce taux est resté normal (Foer...) et, précisément, il s'agissait d'une typhoïde présentant une complication. Par contre, dans d'autres cas de grandes phlegmasies toxi-infectieuses (méningite tuberculeuse, pneumonie, bronchopneumonie), ce taux reste normal. L'augmentation paraît être constante et relativement considérable dans les hépatites infectieuses. De même, dans les maladies rhumatismales, l'augmentation paraît être de règle. Pourant, dans ce cas deux types nettement distincts s'observent. Celui



TABLEAU I. — Taux de l'euglobuline I<sub>1</sub> et valeurs du rapport : euglobuline I<sub>1</sub> sur euglobulines totales chez divers sujets normaux ou pathologiques.

	EU. I <sub>1</sub> p. 1.000	EU. I <sub>1</sub> EU. TOTALES		EU. I <sub>1</sub> p. 1.000	EU. I <sub>1</sub> EU. TOTAL
I. Taux normaux. . . .	≤ 0,6	≤ 8 p. 100	II. Taux pathologiques. . . .	> 0,7	> 8 p. 100
A. 6 sujets sains . . . .	0,2-0,5	4-6	A. Fièvre typhoïde :		
B. Cas pathologiques divers :			8 cas. . . . .	0,8-1	9 à 12
1° Pneumonie . . . .	0,22	4,2	B. Hépatites infectieuses :		
2° Bronchopneumonie . . . .	0,32	4	3 cas. . . . .	1 à 1,8	9,5 à 11
3° Méningite tuberculeuse . . . . .	0,13	1,9	C. Rhumatisme et goutte :		
4° Typhoïde, 1. . . . .	0,39	4,1	1° Goutte, 1 (en crise). . . . .	0,97	12,6
5° Infarctus du myocarde, 1. . . . .	0,52	8,1	2° Goutte, 1 (3 mois après) . . . . .	1,2	21,4
6° Rhumatisme évolutif, 1. . . . .	0,58	5,9	3° Goutte, 2 (en crise) . . . . .	0,82	9,1
7° Anémie . . . . .	0,31	3,7	4° Rhumatisme évolutif, 2. . . . .	0,98	8
8° Néphrite chronique . . . . .	0,33	5,1	5° Rhumatisme articulaire aigu . . . . .	0,99	7
			6° Rhumatisme évolutif, 3. . . . .	1,07	14
			7° Rhumatisme évolutif, 4. . . . .	0,88	14,9
			D. Infarctus du myocarde, 2 (Aur...) :		
			1° . . . . .	2,16	26,7
			2° . . . . .	2,23	39
			3° . . . . .	2,35	38,2

Rappelons que les trois ensembles de données concernant *Aur...* se rapportent à trois saignées successives (voir texte).

ressemblant au rhumatisme articulaire aigu se caractérise par un maintien du rapport : euglobuline I<sub>1</sub> sur euglobulines totales, autour de sa valeur normale malgré une augmentation sensible du taux de l'euglobuline I<sub>1</sub> (tableau I). Donc, cette augmentation, dans ce cas, suit proportionnellement celle du taux des euglobulines totales. Effectivement nous relevons dans ce type de maladie rhumatismale les taux suivants d'euglobulines totales : Du..., 9,9 p. 1.000 ; Fri..., 12,2 p. 1.000 ; X..., 12,7 p. 1.000 ; Dum..., 14,2 p. 1.000, alors que la limite supérieure du taux normal est de 9 p. 1.000. On doit retenir le taux excessivement élevé de 14,2 p. 1.000 dans l'unique cas de rhumatisme articulaire aigu étudié, en fait, le taux le plus élevé que nous ayons observé jusqu'à présent. Les deux cas de goutte, par contre, auxquels paraissent s'ajouter deux cas de rhumatisme évolutif présentent un autre type. Nous relevons ici une augmentation du rapport : euglobuline I<sub>1</sub> sur euglobulines totales, en même temps qu'une augmentation du

taux de l'euglobuline I<sub>1</sub>. Aussi présentement seul ce dernier est modifié, alors que le taux des euglobulines totales est normal ou même plutôt bas.

#### DISCUSSION.

Nous avons jeté un premier coup de sonde dans la pathologie générale, étudiant indistinctement tous les états pathologiques pour ainsi dire. Dès lors, il nous a été impossible de réunir un nombre d'exemples suffisants de chaque cas pour être tout à fait sûr que les modifications constatées caractérisent bien l'état pathologique considéré. Pourtant, nous avons trouvé deux modifications principales de nos diagrammes et il est facile de faire correspondre à chacune d'elles un substratum anatomo-clinique donné. Somme toute, les diverses maladies étudiées ne paraissent aboutir à des modifications de nos données que dans la mesure où elles admettent une raison pathogénique commune. Ainsi, finalement, le substratum anatomo-clinique considéré qui se révèle le même à travers des états pathologiques d'apparence distincte, peut être étayé dès aujourd'hui sur un nombre d'observations relativement considérable.

Nous avons trouvé soit un déplacement de nos diagrammes vers l'alcalinité par rapport à la normale, soit un déplacement vers la région acide.

Les déplacements les plus marqués vers l'alcalinité nous ont été offerts par deux convalescents de fièvre typhoïde, une maladie d'Osler et par un cas de myxœdème. Or, nous devons admettre dans les premiers cas une hyperplasie ou hyperfonctionnement du système réticulo-endothélial sous l'effet irritant prolongé des endotoxines bactériennes. Dans l'insuffisance thyroïdienne expérimentale on observe une augmentation du taux des globulines sériques [3] que l'on retrouve, d'ailleurs, aussi après l'hypophysectomie [4]. D'autre part, un jeu d'inhibition et d'excitation complexe existe entre l'hypophyse, les surrénales et les thyroïdes [5], ce qui laisse supposer que l'action hypophyso-surrénalienne bien connue est la raison de l'hyperglobulinémie. Or, exactement comme la sécrétion adrénotrope de l'hypophyse dissout les tissus lymphoïdes et probablement aussi d'autres parties du réticulo-endothélium par l'intermédiaire des cortico-stéroïdes surrénaux [6], ces tissus s'hypertrophient après l'ablation de l'hypophyse ou des surrénales [7]. Il y a donc tout lieu de croire que chez notre insuffisance thyroïdienne aussi il existe une hyperplasie du système réticulo-endothélial, et nous retrouvons cette hyperplasie comme la raison du déplacement de nos diagrammes vers la région alcaline.

Un cas de glomérulo-néphrite subchronique évolutive nous a donné encore un déplacement assez marqué du diagramme vers

la région alcaline. Or, ici encore, de toute évidence, une toxi-infection prolongée a dû aboutir à l'hyperplasie du réticulo-endothélium. L'« alcalinisation » du diagramme dans l'unique cas de saturnisme étudié peut admettre rationnellement la même raison, l'effet irritant étant ici toxique au lieu d'être toxi-infectieux. Enfin, le déplacement du diagramme vers la région alcaline a encore été observé dans un cas d'anémie. Or, l'anémique en question présentait de la plasmocytose à la ponction sternale et aujourd'hui nous admettons que les plasmocytes apparaissent dans les états d'hyperplasie ou d'hyperfonctionnement du système réticulo-endothélial [8].

Il ne paraît donc pas résulter d'une pure coïncidence que des cas pathologiques aussi variés aboutissent tous à des déplacements de nos diagrammes vers la région alcaline. En effet, nous avons toute raison d'admettre que dans tous ces cas il y a une hyperplasie ou un hyperfonctionnement du système réticulo-endothélial.

Nous avons observé les déplacements les plus marqués des diagrammes vers la région acide dans deux cas de néphrite chronique hypertensive et azotémique en phase terminale et dans deux cas d'infarctus du myocarde. Quant à l'« hypertension maligne » qui caractérise la phase terminale du mal de Bright, nous avons alors des périartérites diffuses qui font suite à la dégénérescence fibrinoïde et à la nécrose des artérioles [9]. Ici, donc, la relation entre l'« acidification » de nos diagrammes et l'aplasie réticulo-endothéliale est manifeste. Or, de prime abord, l'aplasie ou le blocage du système réticulo-endothélial doivent être admis aussi dans l'infarctus du myocarde. En effet, l'aplasie en est souvent la raison et un blocage réflexe pourra en résulter.

Le blocage réticulo-endothélial est manifeste dans la méningite tuberculeuse, où, dans une phase septicémique terminale, les toxines bacillaires inondent l'organisme et nous comprenons pourquoi notre diagramme est déplacé, dans ce cas encore, vers la région acide.

Il convient donc d'admettre que les déplacements de nos diagrammes vers la région alcaline résultent d'une hyperplasie ou d'un hyperfonctionnement du système réticulo-endothélial, alors que leurs déplacements vers la région acide expriment l'aplasie ou le blocage de ce système. Ainsi ces diagrammes donnent la « fiche réticulo-endothéliale » des sujets.

Le taux de l'euglobuline  $I_1$  constitue une donnée indépendante. Aussi nous pouvons admettre qu'il est le test de l'état d'une lignée particulière du système réticulo-endothélial. Ce taux reste constant dans de nombreuses toxi-infections graves (pneumonie, bronchopneumonie, méningite tuberculeuse), alors qu'il augmente constamment dans la fièvre typhoïde et dans les hépatites infectieuses.



Or, les bacilles typhiques, par leur affinité bien connue pour les voies biliaires, doivent toucher aussi le tissu hépatique. Il n'est donc pas impossible que le taux de l'euglobuline  $I_1$  ait quelque chose à faire avec la lignée réticulo-endothéliale à laquelle appartiennent les cellules de Kupffer.

Nous voyons d'emblée que nos données sont indépendantes et, jusqu'à un certain point, bien plus subtiles que celles fournies par les diagrammes électrophorétiques. Ici prédominent des modifications qui intéressent les  $\alpha$ -globulines et que l'on retrouve dans l'infarctus du myocarde, dans le début des maladies aiguës et fébriles, dans le rhumatisme articulaire aigu, etc. [10]. Ceci se comprend d'ailleurs aisément puisque chez l'animal également tous les traumatismes et tous les états de choc expérimentaux aboutissent à l'augmentation du taux des  $\alpha$ -globulines et à l'apparition d' $\alpha$ -globulines anormales [11]. L'électrophorèse des fractions comparables contenues dans le sérum de cheval nous a prouvé que, dans ce cas, les euglobulines obtenues par notre technique sont constituées presque exclusivement d'un mélange de  $\gamma$ -globulines [12]. Il serait tentant d'étendre cette conclusion au sérum humain et, dans ce cas, nos diagrammes donneraient le dessin de la composition intime des  $\gamma$ -globulines. Nous avons conclu dans ce sens simplement par leur analyse physico-chimique détaillée [2]. Mais nous réservons pour l'avenir la conclusion ferme à ce sujet, lorsque nous aurons à notre disposition les données électrophorétiques concernant nos euglobulines dans le cas du sérum humain.

#### RÉSUMÉ.

1° Les limites de variations de trois données sont établies dans les conditions physiologiques : a) le taux sérique de la fraction protéidique qui précipite lors d'une dialyse de quarante-huit heures contre une solution de tampon phosphate de Clark et Lubbs M/150 de pH, 7,6 à 7,7 [euglobuline  $I_1$ ]; b) les taux de précipitabilité en fonction du pH des protéides sériques en présence du même tampon M/600, et c) le taux sérique des protéides totaux ainsi précipités.

2° Dans certains états pathologiques, les taux de précipitabilité sont plus élevés au-dessus de pH 6 qu'à l'état normal et, dans d'autres états, ces taux sont plus bas qu'à l'état normal. Dans les premiers états on peut admettre l'hyperplasie ou l'hyperfonctionnement du système réticulo-endothélial, et dans les seconds l'aplasie ou le blocage de ce système.

3° Le taux de l'euglobuline  $I_1$ , constamment augmenté dans les hépatites infectieuses et la fièvre typhoïde, constitue une donnée indépendante. On peut supposer que ce taux est le test de l'état d'une lignée particulière du système réticulo-endothélial.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] SANDOR (G.) et BESSIS. *C. R. Acad. Sci.*, 1946, **223**, 962. — SANDOR (G.). *C. R. Acad. Sci.*, 1948, **227**, 378 ; 1949, **228**, 282.
- [2] SANDOR (G.) et CEDDAHA. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1949, **31**, 1525.
- [3] GOLDBERG. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **128**, 135. — LEVIN et coll. *Am. J. Physiol.*, 1942, **136**, 306 ; 1943, **138**, 258.
- [4] MOORE, LEVIN et LAELLEM. *J. Biol. Chem.*, 1944, **153**, 349. — MOORE, LEVIN et SMELSER. *J. Biol. Chem.*, 1945, **157**, 723.
- [5] SOFFER, GABRILOVE et JAILER. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1949, **71**, 117.
- [6] DAUGHERTY et WHITE. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1943, **53**, 132. — SIMPSON, REINHARDT et EVANS. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1943, **54**, 135.
- [7] REINHARDT et HOLMES. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1940, **45**, 207.
- [8] BING et coll. *Acta med. scand.*, 1937, **92**, 415 ; 1940, **103**, 547 ; *Acta path. et microb. scand.*, 1944, **21**, 455 ; *Acta physiol. scand.*, 1945, **10**, 282.
- [9] GOLDBLATT. *Physiol. Rev.*, 1947, **27**, 120.
- [10] LONGSWORTH, SHEDLOVSKY et MACINNES. *J. exp. Med.*, 1939, **70**, 399. — LUETSCHER Jr. *J. clin. Invest.*, 1941, **20**, 99. — SHEDLOVSKY et SCUDDER. *J. exp. Med.*, 1942, **75**, 119. — SEIBERT et coll. *Am. Rev. Tub.*, 1943, **47**, 66 ; *J. clin. Invest.*, 1947, **26**, 90. — RUTSTEIN, CLARKE et TARAN. *Science*, 1945, **101**, 669. — DOLE et coll. *J. clin. Invest.*, 1945, **24**, 644. — COHN (C.) et LINDMAN. *J. clin. Invest.*, 1946, **25**, 145. — SVARTZ et OLHAGEN. *Acta med. scand.*, 1948, **130**, Suppl. 456.
- [11] GJESSING et CHANUTIN. *J. biol. Chem.*, 1946, **165**, 413-421. — GJESSING, LUDIEWIG et CHANUTIN. *J. biol. Chem.*, 1947, **170**, 551.
- [12] SANDOR (G.) et DE MENDE. *Soc. Chim. biol.*, séance du 16 mai 1950 ; *Bull. Soc. Chim. biol. (sous presse)*.

# RECHERCHES SUR LA SENSIBILITÉ *IN VITRO* DU BACILLE DU ROUGET AUX ANTIBIOTIQUES

par J. VERGE, P. GORET, L. JOUBERT et L. CAUCHY

[avec la collaboration de G. SAUGÉ et M. ANGOT] (\*).

(Laboratoires de Bactériologie des Ecoles Vétérinaires d'Alfort  
et de Lyon.)

La sensibilité du bacille du rouget aux antibiotiques a déjà fait l'objet de nombreux travaux. Les résultats publiés varient toutefois avec les expérimentateurs. Désirant poursuivre des essais de traitement du rouget du porc par la pénicilline au cours d'une sévère enzootie, nous avons cru bon de reprendre ces recherches *in vitro* et *in vivo*. Nous n'envisagerons ici que la sensibilité du germe *in vitro*.

## A. — ACTION DE LA PÉNICILLINE.

Le bacille du rouget figure dans la liste des bactéries sensibles à la pénicilline, sans que de bien grandes précisions soient souvent apportées (Woodbine, Jennings, Collins [1]). Cependant, Heillmann et Herrel [2], dès 1944, précisent que la culture du germe est inhibée grâce à l'addition de 100 U. O. de l'antibiotique par centimètre cube. Pour Grey [3], en revanche, l'inhibition de la culture est complète pour la dose de 0,1 U. O. par centimètre cube et partielle pour la dose de 0,01 U. O. par centimètre cube. Cette disparité considérable observée dans les résultats provient, vraisemblablement, soit de la technique de titrage, soit d'une variation importante dans la sensibilité des souches que souligne d'ailleurs Grey.

Nous avons titré, selon deux techniques différentes, la sensibilité de deux souches de bacilles du rouget : souches D et M.

1° Selon la technique classique des dilutions (Oxford), une série de tubes d'eau peptonée glucosée (10 cm<sup>3</sup>) sontensemencés avec 0,05 cm<sup>3</sup> d'une dilution à 1 p. 100 d'une culture de vingt-quatre heures dans le même milieu. Dans chaque tubeensemencé, la pénicilline est introduite suivant une gamme de concentration progressivement décroissante. Les résultats sont lus après un séjour de vingt-quatre et quarante-huit heures à l'étuve.

(\*) Société Française de Microbiologie, séance du 6 avril 1950.



Le tableau suivant rend compte du résultat d'un de nos essais qui furent toujours à peu près semblables :

SOUCHE D			SOUCHE M		
U.O./cm <sup>3</sup>	24 heures	48 heures	U.O./cm <sup>3</sup>	24 heures	48 heures
0 . . . . .	+++	+++	0 . . . . .	+++	+++
0,1 . . . . .	—	—	0,1 . . . . .	—	—
0,09 . . . . .	—	—	0,09 . . . . .	—	—
0,08 . . . . .	—	—	0,08 . . . . .	—	—
0,07 . . . . .	—	—	0,07 . . . . .	—	—
0,06 . . . . .	—	+	0,06 . . . . .	—	—
0,05 . . . . .	+	++	0,05 . . . . .	—	—
0,04 . . . . .	++	+++	0,04 . . . . .	—	—
0,03 . . . . .	+++	+++	0,03 . . . . .	±	±
0,02 . . . . .	+++	+++	0,02 . . . . .	—	+

De l'examen de ces résultats, il découle que la sensibilité du bacille du rouget varie avec les souches : la souche D est sensible à 0,06, — 0,07 unités de pénicilline par centimètre cube, tandis que la souche M manifeste sa sensibilité à l'égard de 0,03 — 0,04 unités par centimètre cube.

2° Dans un autre essai, on utilise une culture de vingt-quatre heures sur bouillon dont on ensemence III gouttes sur milieu T. La pénicilline est introduite dans les milieux à doses progressivement croissantes de 0,1 U. O. à 2 U. O. par centimètre cube. On utilise 9 tubes de milieu pour chaque concentration de pénicilline. Les résultats lus au bout de vingt-quatre heures peuvent être résumés dans le tableau ci-après (p. 147).

La lecture de ce tableau indique que cette seconde technique est plus sévère, mais moins précise que la première. On remarque que la sensibilité des deux souches varie presque du simple au double pour des quantités de pénicilline dix fois supérieures à celles nécessaires à l'inhibition selon le procédé tout d'abord utilisé.

#### B. — ACTION DE LA STREPTOMYCINE.

La sensibilité du bacille du rouget à la streptomycine a été signalée par Woodbine [1], Grey [4], Karlson et Feldmann [5]. Pour Woodbine la pénicilline serait, *in vitro*, cent fois plus active que la streptomycine.

Seule la sensibilité de la souche D a été éprouvée selon notre technique primitive des dilutions ; nos résultats ont été ramenés en « unités » de streptomycine que nous avons utilisée sous deux formes : streptomycine cristallisée pure et extrait acide de mycélium de *Streptomyces griseus* [6].

1° *Streptomycine pure*. — Les tableaux suivants rendent compte

CONCENTRATION en pénicilline	N° DES TUBES	SOUCHE M	SOUCHE D
0 (Témoins) . . . . .	1	+	+
	2	+	+
	3	+	+
	4	+	+
	5	+	+
	6	+	+
	7	+	+
	8	+	+
	9	+	+
0,1 U.O./cm <sup>3</sup> . . . . .	1	+	+
	2	+	+
	3	+	+
	4	+	+
	5	+	+
	6	+	+
	7	+	+
	8	+	+
	9	+	+
0,2 U.O./cm <sup>3</sup> . . . . .	1	+	+
	2	+	+
	3	+	+
	4	+	+
	5	+	+
	6	+	+
	7	+	±
	8	+	±
	9	—	±
0,5 U.O./cm <sup>3</sup> . . . . .	1	+	+
	2	+	+
	3	—	+
	4	—	+
	5	—	+
	6	—	±
	7	—	±
	8	—	±
	9	—	±
1 U.O./cm <sup>3</sup> . . . . .	1	—	±
	2	—	—
	3	—	—
	4	—	—
	5	—	—
	6	—	—
	7	—	—
	8	—	—
	9	—	—
2 U.O./cm <sup>3</sup> . . . . .	1	—	—
	2	—	—
	3	—	—
	4	—	—
	5	—	—
	6	—	—
	7	—	—
	8	—	—
	9	—	—

+, Culture —, aucune culture ; ±, très léger trouble.

de deux de nos essais, d'où il résulte que la sensibilité du bacille du rouget à la streptomycine est de l'ordre de 25 à 60 unités par centimètre cube.

U./cm <sup>3</sup>	24 HEURES	U./cm <sup>3</sup>	24 HEURES
100	—	100	—
80	—	80	—
75	—	75	—
60	—	60	—
50	+	50	—
25	+	25	—
10	+	10	+
5	+	5	+
1	+	1	+

2° *Extrait acide de Mycélium.* — Les résultats ci-dessous mettent en lumière la sensibilité du bacille à 30 à 40 unités d'extrait acide de voile de *Streptomyces griseus*.

U./cm <sup>3</sup>	24 HEURES	U./cm <sup>3</sup>	24 HEURES
100	—	100	—
85	—	75	—
50	—	50	—
40	—	40	—
30	—	30	+
20	++	20	++
10	++	10	++
5	++	5	++
1	++	1	++

#### CONCLUSIONS.

Ces recherches soulignent d'abord la nécessité d'une technique standard de titrage pour que les résultats puissent être comparables entre eux.

Elles confirment la grande sensibilité *in vitro* du bacille du rouget vis-à-vis de la pénicilline et les variations de cette sensibilité avec les souches. Elles mettent également en lumière la relative résistance du germe vis-à-vis de la streptomycine *in vitro*.

Il reste à rechercher si les mêmes conclusions peuvent être appliquées à l'activité *in vivo* des mêmes antibiotiques.



BIBLIOGRAPHIE

- [1] WOODBINE. *Veter. J.*, 1946, **102**, 88.  
JENNINGS. *Veter. Rec.*, 1947, **59**, 369.  
COLLINS. *J. Am. veter. med. Assoc.*, 1948, **113**, 330.
- [2] HEILLMANN et HERREL. *Proceed. Mayo Clin.*, 1944, **19**, 340.
- [3] GREY. *Veter. med.*, 1947 **42**, 74.
- [4] GREY. *Veter. med.*, 1947, **42**, 226.
- [5] KARLSON et FELDMANN. *J. Am. veter. med. Assoc.*, 1947, **110**, 63.
- [6] GORET, JOUBERT, BOYER et GRUMBACH. *C. R. Acad. Sci.*, 1947, **225**,  
962 et 1948, **226**, 2011.

# RECHERCHES SUR LA SENSIBILITÉ *IN VIVO* DU BACILLE DU ROUGET AUX ANTIBIOTIQUES

par J. VERGE, P. GORET, L. JOUBERT et L. CAUCHY

avec la collaboration de G. SAUGE et M. ANGOT. (\*)

(Laboratoires de Bactériologie des Ecoles vétérinaires  
d'Alfort et de Lyon.)

## A. — ACTION DE LA PÉNICILLINE.

La valeur de la pénicilline chez les animaux de laboratoire (souris et pigeons) expérimentalement infectés par le bacille du rouget est très discutée [1]. Ce fait tient à ce que les techniques de titrage les plus diverses ont été utilisées. En effet, la quantité de germes inoculés, le moment du traitement, la dose d'antibiotique et le mode d'administration constituent autant de facteurs qui varient avec chaque expérimentateur ou avec chaque essai. On aboutit, en ces conditions, à une série de résultats difficiles ou même impossibles à interpréter.

La technique, maintenant classique, de titrage *in vivo* exige que l'antibiotique soit administré immédiatement après ou dans l'heure qui suit l'inoculation de la dose d'épreuve de bacille du rouget. L'administration de l'antibiotique doit, d'autre part, être renouvelée : en général, on pratique deux injections quotidiennes pendant quarante-huit heures ou trois jours.

Nous avons recherché l'action de la pénicilline sur l'infection expérimentale de la souris. Soulignons tout de suite que cet animal, quoique très sensible au rouget, se prête assez mal, et beaucoup moins bien que le pigeon, aux essais. En effet, les souris d'un même lot peuvent succomber à l'infection dans des délais irréguliers, qui varient de deux à six-sept jours, pour des doses infectantes identiques. Or, on sait que l'on ne peut bien juger de l'action *in vivo* d'un antibiotique que si les témoins succombent rapidement à une infection judicieusement dosée.

Deux séries de recherches ont été effectuées en utilisant les souches D et M dont nous connaissons la sensibilité *in vitro* à la

(\*) Société Française de Microbiologie, séance du 6 avril 1950.

pénicilline [2]. La dose minima mortelle des souches était de 1/1.000.000 de centimètre cube (culture de vingt-quatre heures en bouillon T et de dix-huit heures en bouillon ascite).

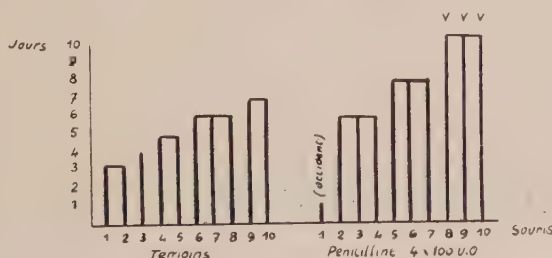
1° PREMIÈRE SÉRIE DE RECHERCHES. — Les souris reçoivent 1.000 doses minima mortelles par voie péritonéale et sont traitées avec des doses variables d'antibiotique, à raison d'une injection toutes les douze heures pendant quarante-huit heures, la première injection étant faite immédiatement après l'inoculation virulente. Les animaux sont observés pendant dix jours.

Chaque souris morte fait naturellement l'objet d'un contrôle bactériologique.

Les graphiques suivants rendent compte de nos résultats.

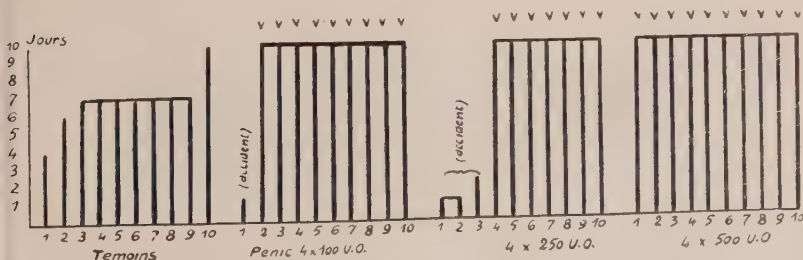
SOUCHÉ D. — Culture de vingt-quatre heures en bouillon T. Dilution en eau physiologique.

Premier essai. — 4 injections de 100 U. O. à douze heures d'intervalle.



GRAPHIQUE 1.

Deuxième essai. — Premier lot : 4 injections de 100 U. O. à douze heures d'intervalle ; deuxième lot : 4 injections de 250 U. O. à douze heures d'intervalle ; troisième lot : 4 injections de 500 U. O. à douze heures d'intervalle.



GRAPHIQUE 2.



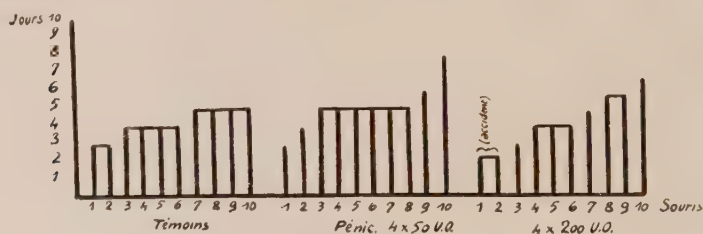
On remarquera que la mort des témoins a été particulièrement lente dans le deuxième essai.

On peut raisonnablement conclure qu'en ce qui concerne cette souche D, la dose active de pénicilline se situe entre 400 à 800 unités, réparties en 4 injections de 100 à 200 U. O. à douze heures d'intervalle.

Notons, à titre indicatif, que les souris survivantes se montrèrent sensibles, un mois plus tard, à l'inoculation de 50 doses minima mortelles du bacille. Aucune immunité n'avait donc été acquise. Ce fait confirme les constatations analogues enregistrées par d'autres auteurs, en particulier par Mantovani chez la souris [4] et par Paille chez le pigeon [3].

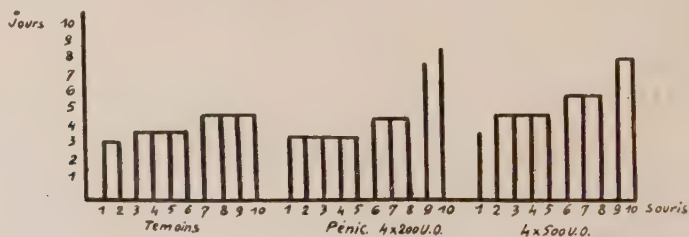
2° DEUXIÈME SÉRIE DE RECHERCHES. — a) SOUCHE D. — Culture de dix-huit heures en bouillon-ascite ; dilution en solution de Tyrode.

*Premier essai.* — Premier lot : 4 injections de 50 U. O. à douze heures d'intervalle ; deuxième lot : 4 injections de 200 U. O. à douze heures d'intervalle.



GRAPHIQUE 3.

*Second essai.* — Premier lot : 4 injections de 200 U. O. à douze heures d'intervalle ; deuxième lot : 4 injections de 500 U. O. à douze heures d'intervalle.



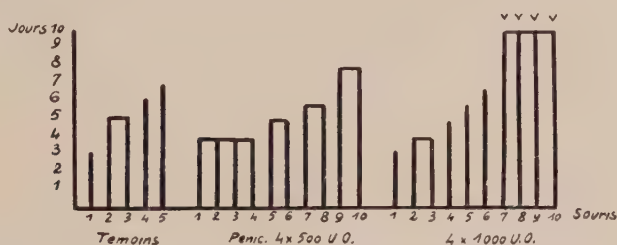
GRAPHIQUE 4.

Ces résultats nous indiquent que pour une même souche, mais

en culture plus jeune, en milieu ascite, incomparablement plus favorable et en diluant (solution de Tyrode) mieux adapté, l'infection expérimentale est plus sévère et la pénicilline se révèle incapable de protéger complètement les animaux. Il existe seulement une légère survie par rapport aux animaux témoins.

b) SOUCHE M. — Culture de dix-huit heures en bouillon-ascite ; dilution en solution de Tyrode.

Premier lot : 4 injections de 500 U. O. à douze heures d'intervalle ; second lot : 4 injections de 1.000 U. O. à douze heures d'intervalle.



GRAPHIQUE 5.

Ces résultats confirment les essais *in vitro*. Les 2 souches révèlent *in vivo* à peu près la même sensibilité vis-à-vis de l'antibiotique. Avec de fortes doses, on n'enregistre la survie que de 4 sujets (observation arrêtée au dixième jour, souche M).

## B. — ACTION DE LA STREPTOMYCINE.

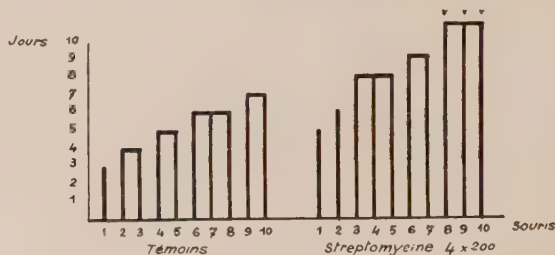
La streptomycine exerce *in vitro*, à l'égard du bacille du rouget, une action relativement faible, comparée à celle de la pénicilline. Woodbine et Cheeseman [4] ont, de plus, souligné le peu d'intérêt présenté par cet antibiotique dans le traitement de l'infection expérimentale de la souris.

En revanche, Grey [5], fait paradoxal en apparence, estime la streptomycine bien supérieure à la pénicilline dans le traitement du rouget spontané du dindon. Toutefois, les doses de streptomycine, utilisées par cet auteur, s'avèrent supérieures aux doses de pénicilline employées comparativement.

1° PREMIÈRE SÉRIE DE RECHERCHES. — Nous avons repris l'expérience sur les souris, en utilisant, d'une part, de la streptomycine cristallisée pure et, d'autre part, un extrait acide de mycélium de *Streptomyces griseus*. Technique classique de titrage. Seule la

souche D a été utilisée; culture de vingt-quatre heures en bouillon T. Dilution en eau physiologique.

a) *Streptomycine pure*. — Le graphique ci-dessous rend compte de nos essais.



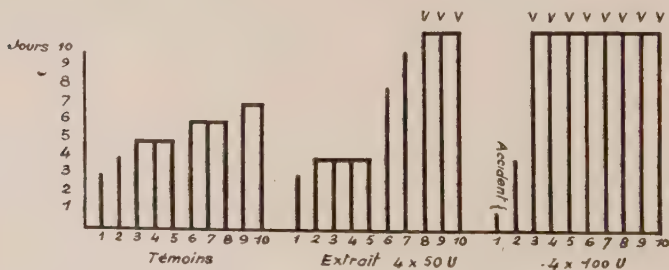
GRAPHIQUE 6.

On remarquera qu'à nombre d'unités égales, la streptomycine se révèle moins active que la pénicilline. Mais si l'on considère, en revanche, la faible sensibilité, *in vitro*, du germe à l'antibiotique (20-60 unités), on est frappé par les faibles doses nécessaires *in vivo* pour obtenir un résultat non négligeable. Les doses actives *in vivo* devraient théoriquement être beaucoup plus considérables, compte tenu de la résistance du germe *in vitro*.

Il existe donc une dissociation, pour la streptomycine, entre ses activités *in vivo* et *in vitro*.

Les survivants ne résistent pas à une épreuve virulente pratiquée un mois plus tard.

b) *Extrait acide de mycélium de Streptomyces griseus*. — *Premier essai*. — Premier lot : 4 injections de 50 U. à douze heures d'intervalle; second lot : 4 injections de 100 U. à douze heures d'intervalle.



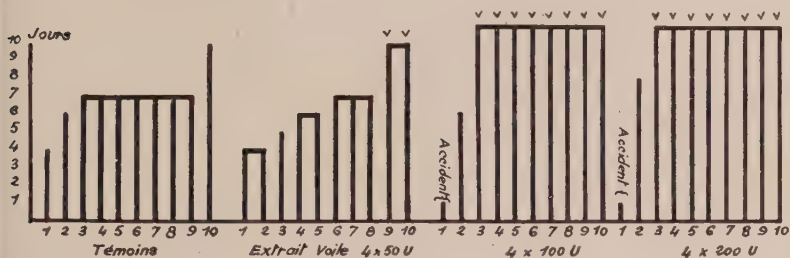
GRAPHIQUE 7.

Eprouvés un mois plus tard avec 50 DMm, les sujets sur-



vivants succombèrent à l'infection. Ici encore l'immunité ne s'est pas installée.

*Deuxième essai.* — Premier lot : 4 injections de 50 U. à douze heures d'intervalle ; deuxième lot : 4 injections de 100 U. à douze heures d'intervalle ; troisième lot : 4 injections de 200 U. à douze heures d'intervalle.

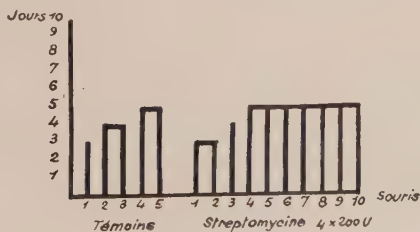


GRAPHIQUE 8.

On voit que l'extrait acide de mycélium s'est révélé, sur le rouget expérimental de la souris, d'une activité remarquable. Cependant l'épreuve d'immunité, pratiquée un mois plus tard, est négative.

2° DEUXIÈME SÉRIE DE RECHERCHES. — Technique classique de titrage. Culture de dix-huit heures en bouillon ascite ; dilution en milieu de Tyrode.

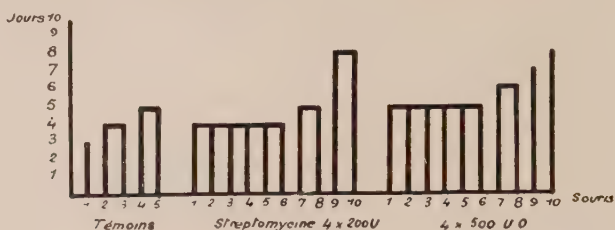
A. SOUCHE D. — *Premier essai.* — 4 injections de 200 U. à douze heures d'intervalle.



GRAPHIQUE 9.

*Deuxième essai.* — Premier lot : 4 injections de 200 U.

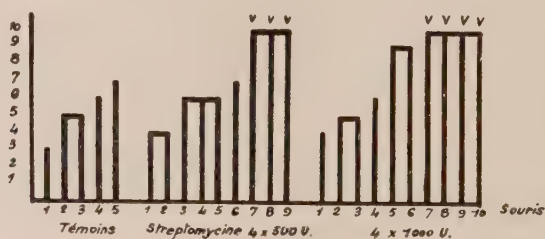
à douze heures d'intervalle ; second lot : 4 injections de 500 U. à douze heures d'intervalle.



GRAPHIQUE 10.

Les résultats sont superposables à ceux enregistrés au cours de l'étude, dans les mêmes conditions, de la sensibilité du germe à la pénicilline *in vivo* : survie plus ou moins prolongée, absence de protection lors d'une inoculation d'épreuve sévère et rapidement mortelle.

B. SOUCHE M. — Premier lot : 4 injections de 500 U. à douze heures d'intervalle ; second lot : 4 injections de 1.000 U. à douze heures d'intervalle.



GRAPHIQUE 11.

La protection, dans le cas de la souche M, est beaucoup plus marquée. Cette souche se révèle donc nettement plus sensible *in vivo* à la streptomycine que la souche D. Pas d'immunité acquise chez les survivants.

#### CONCLUSIONS.

1° La sensibilité du bacille du rouget à l'action de la pénicilline et de la streptomycine varie avec les souches étudiées ;

2° L'action *in vivo* des antibiotiques vis-à-vis du bacille du

rouget (comme d'ailleurs des autres germes) est sous la dépendance :

- a) De la technique de titrage utilisée ;
- b) De la sévérité de l'épreuve ;
- c) De la sensibilité individuelle des souris.

3° Dans l'ensemble, nos conclusions rejoignent, en particulier, celles de Woodbine : la pénicilline ne présente qu'une faible action protectrice vis-à-vis de l'infection expérimentale de la souris. Il en est de même de la streptomycine, bien que cet antibiotique s'avère supérieur.

4° Néanmoins, les résultats obtenus lors d'épreuves virulentes se rapprochant des conditions naturelles de l'infection (évolution relativement lente) suggèrent l'idée que les deux antibiotiques doivent trouver d'heureuses indications dans le traitement du rouget spontané de l'homme et des animaux.

Cette thérapeutique a, d'ores et déjà, largement fait ses preuves dans l'érysipéloïde de l'homme et dans le rouget du porc et des oiseaux.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] HARVEY, LIBBY et WALLER. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1944, **60**, 307.  
HEILLMANN et HERREL. *Proceed. Mayo Clin.*, 1944, **19**, 340.  
VAN ES, OLNEY et BLORE. *Res. Bull. Nebraska*, 1945, **141**, 1.  
WOODBINE. *Veter. J.*, 1946, **102**, 88.  
PARNAS, MECINSKI, ERENBERG et STEP Koski. *Med. Veter.*, 1946, **2**, 201.  
GREY. *Veter. med.*, 1947, **42**, 74.  
CECCARELLI. *Est. del. Boll. Soc. Eustachiana.*, 1947, Tipog. Ed. Picina Camerino.  
MANTOVANI (G.). *Profilassi*, 1949, **22**, 85.  
KUBIN (G.). *Wien. Tier. Monatsch.*, 1949, **36**, 434.
- [2] VERGE (J.), GORET (P.), JOUBERT (L.) et CAUCHY (L.). *Ces Annales*, 1950, **79**, 145.
- [3] PAILLE. *Bull. Acad. vétér. France*, 1949, **22**, 280.
- [4] WOODBINE et CHEESEMAN. *Veter. J.*, 1947, **103**, 149.
- [5] GREY. *Veter. med.*, 1947, **42**, 216.



## LES COLIFORMES ET GROUPES VOISINS

par J. BRISOU.

(Ecole de Santé Navale et Coloniale, Bordeaux.)

### INTRODUCTION. DÉFINITION.

La tribu des coliformes englobe toutes les Entérobactériacées attaquant le lactose avec formation d'acides et souvent de gaz. A de très rares exceptions près, ces germes ne liquéfient pas la gélatine. Il s'agit donc de bacilles Gram-négatifs, immobiles ou peu mobiles, non sporulés, anaérobies facultatifs, cultivant aisément et rapidement sur tous les milieux usuels. Ils font fermenter un grand nombre de sucres, réduisent les nitrates en nitrites et donnent souvent de l'indole. On les rencontre partout dans la nature ; hôtes normaux de l'intestin de l'homme et des animaux, ils peuvent, dans certaines conditions, devenir pathogènes.

Le terme de « coliforme », que l'on doit à Bread et Norton (1937), se confond avec celui d'« *Escherichiae* », première tribu des *Enterobacteriaceae*. On subdivisait cette tribu en trois genres : *Escherichia*, *Aerobacter* et *Klebsiella*. Kauffmann en 1949 [1] a proposé d'y adjoindre le groupe *Alkalescens-dispar* (classé jusqu'ici dans les *Shigella*), et le genre *Serratia*. Ce dernier ne comprend que des espèces chromogènes. A.-R. Prévot (1) le place dans la famille des *Pseudomonadaceae*, tribu II, genre IV. Ces bactéries n'ayant aucun intérêt médical actuel, nous ne les envisagerons pas ici.

Nous avons eu plusieurs fois l'occasion d'insister sur l'extrême richesse de cette tribu [1 bis, 2] et de discuter les différentes classifications proposées. On a voulu, en prenant les caractères biochimiques pour base, différencier des coliformes fécaux et des coliformes non fécaux. Nous avons souligné avec E. Magrou [3] la fragilité des tests proposés. On peut rencontrer toutes les variétés de coliformes dans l'intestin de l'homme sain ou de l'homme malade ; on les retrouve tout aussi bien dans d'autres

(1) A.-R. PRÉVOT, *Manuel de class. et déterm. Anaérob.*, Masson, Paris, 1948.

produits pathologiques comme la bile, les urines, le pus, etc. (Kauffmann, H. Mondolfo et H. Hounié, R. Buttiaux et A. Kesteloot, J. Brisou [4, 5, 6, 7]).

L'extrême variété des coliformes, leur ubiquité, ont tourmenté les bactériologues et leur posent encore un certain nombre de problèmes. On peut sans peine étudier les deux genres *Escherichia* et *Aerobacter* dans un même paragraphe. Bon nombre de leurs caractères sérologiques se confondent. Leur pouvoir pathogène est identique ; il en va de même de leur signification épidémiologique. Il n'est pas interdit, enfin, de considérer les deux genres actuels comme deux variétés d'un même genre. L'étude des coliformes a suivi les étapes classiques : morphologique, dont on a tiré relativement peu d'enseignements ; biochimique, plus riche, et sérologique, toute neuve et qui ne cadre pas avec les données de la seconde étape.

Nous pensons qu'il faut abandonner le terme « Colibacille » au singulier. Il n'y a pas de colibacille, au sens d'une entité microbienne bien individualisée. On peut, dans une certaine mesure, parler du Bacille pesteux, de la Bactéridie charbonneuse, du Bacille d'Eberth, etc., on ne peut pas dire « le Colibacille ». Il n'y a que des Coliformes ou des « Colibacilles ». Il n'existe, parmi les innombrables variétés, aucune forme, aucun type suffisamment adapté à l'espèce humaine et spécifiquement pathogène qui puisse mériter l'étiquette singulière de « Colibacille ».

Nous n'avons pas à insister ici sur les caractères morphologiques et culturels classiques des Coliformes suffisamment étudiés dans les traités. Nous passerons simplement en revue, pour les discuter, les caractères les plus essentiels.

#### PRINCIPAUX TESTS BIOCHIMIQUES.

Le vocable mnémotechnique « IMVIC » de Parr rappelle les initiales des 4 tests principaux d'identification des Coliformes : I, Indole ; M, réaction au rouge de méthyle ; V, réaction de Voges Proskauer (recherche de l'acétyl-méthyl-carbinol) ; I. C., culture sur citrate de soude.

A ces 4 tests on peut ajouter la recherche de l' $H_2S$ , le pouvoir réducteur sur le rouge neutre, l'action sur la gélatine, la cellobiose, l'urée et différents produits azotés, les tests de Mc Conkey, d'Eijkmann, etc.

La systématique de Rahn (1936) est encore, à l'heure actuelle, très en faveur. Nous la reproduisons au tableau I. Elle se base sur les tests de l'IMVIC et quelques réactions secondaires.

UTILISATION DE L'AZOTE. — Les coliformes du groupe *Escherichia-Aerobacter* peuvent utiliser certains produits azotés dont

on doit faire l'étude dans des conditions parfaitement définies. Les milieux minéraux simples ou glucosés sont préférables à tous les autres (Mitchell et Lévine, West et al., J. Brisou) [8]. On a étudié le comportement des coliformes vis-à-vis de l'acide urique, de l'allantoïdine, de l'hydantoïdine, de l'uracil et enfin de l'urée. Le test de l'urée, le plus étudié, chez les *Entérobactériacées* a été reconsidéré par un certain nombre d'auteurs. On soulignera particulièrement les travaux de Blake Christensens [9], Ferguson et Hook [10], Rustigian et Stuart [11], Kauffmann [4], J. Brisou [8]. Les divergences des résultats doivent être recherchées sur le plan technique. Nous rejetons les milieux additionnés de peptones, d'extraits de levure ou de tout autre produit mal défini. Si l'on s'adresse à des milieux minéraux ne contenant que des traces d'alcool ou de glucose comme source de carbone en plus de l'urée, on ne trouve aucun coliforme capable, en vingt-quatre heures, de transformer l'urée en carbonate d'ammoniaque.

TABLEAU I.

Genre *Escherichia* :

M = +			
V = O	H <sub>2</sub> S = + :	<i>Escherichia coli</i> . .	{ Indole + : type I. Indole = O : type II.
C = O			
	H <sub>2</sub> S = O :	<i>Escherichia freundii</i> .	{ Indole = O : type I. Indole = + : type II.

Genre *Aerobacter* :

M = O	Glycérol : AG.	{ <i>Aerobacter aerogenes</i> { Indole = + I. Indole = O : II.
V = +	Gélatine — O.	
C = +	Glycérol : A.	{ <i>Aerobacter cloacæ</i> : Indole : O. H <sub>2</sub> S = + ou —.
	Gélatine : +.	

AG = acides et gaz ; A = acides seulement.

ACTION SUR D'AUTRES PRODUITS CHIMIQUES. — Hajna et D. Mon (1934), Hajna et Perry (1939), conseillent les cultures en milieux définis additionnés de malonate de soude, de propylène-glycol ou d'hippurate de soude. Pour ces auteurs :

*Aerobacter aerogenes* : cultive sur malonate et hippurate.

*Aerobacter cloacæ* : ne pousse pas sur hippurate.

*Intermediate* : pousse sur propylène-glycol, seulement.



R. T. Tittsler et L. A. San Holzer (1935) ont spécifié enfin que : *Escherichia coli* n'attaque pas l' $\alpha$ -méthylglucoside.

*Aerobacter* attaque ce produit tandis que le type « Intermediate » ne le dédouble qu'une fois sur trois.

L'arsenal enzymatique des coliformes est extrêmement riche. Ces bactéries possèdent un grand nombre d'enzymes constitutifs et semblent capables délaborer aisément les enzymes d'adaptation. Les 4 tests de « l'IMVIC » répondent donc aux caractères les plus stables. Ils autorisent une systématique utile pour la pratique courante. Toutefois, il n'est pas sans intérêt de passer en revue quelques autres réactions :

Le glucose, le lactose, le mannitol, le maltose et l'arabinose sont toujours attaqués par les genres *Escherichia-Aerobacter*. Pour les autres glucides les résultats sont variables. D'après un travail de Kauffmann portant sur l'observation de 100 souches (1949), le sorbitol fut attaqué 96 fois ; le xylose, 94 ; le rhamnose, 85 ; le dulcitol, 40 ; le saccharose, 22 ; la salicine, 12 ; l'adonitol, 11, et l'inositol une fois seulement. Kauffmann a pu suivre certaines souches pendant plusieurs années ; il insiste sur la fixité des caractères des souches conservées au laboratoire. Ceci ne doit pas étonner ; on sait, en effet, que la variabilité des souches peut être envisagée comme un des reflets de l'adaptation aux modifications de milieu. Les variations se manifestent surtout à l'occasion d'un changement des conditions physiques ou chimiques imposées à la bactérie. Les germes de laboratoire observés en tubes sur des milieux toujours identiques ont moins de chances de varier que les germes soumis aux conditions naturelles. Un travail de West (1941) retiendra aussi notre attention. Il est résumé dans le tableau suivant :

SOUCHES	<i>Escherichia</i> (1)	<i>Intermediate</i>	<i>Aerobacter cloacae</i>	<i>Aerobacter aerogenes</i>
V. P. . . . .	0	0	100	100
Citrate . . . .	0	100	100	100
H <sub>2</sub> S. . . . .	0	86,5	0	0
Indole . . . .	90	26,7	7,6	48,8
Glycérol . . .	40	100	0	95,2
Aesculine. . .	85	20	100	100
Salicine. . . .	85	20	99,4	100
Amidon. . . .	10	6,7	0	87,1

(1) Les chiffres indiquent le pourcentage de réactions positives.

L'épreuve du citrate de soude reste une des plus spécifiques

pour séparer les deux genres *Escherichia* et *Aerobacter*. Le groupe « Intermediate » est admis dans la classification de Bergey depuis 1939. Il englobe les espèces dont l'action sur le citrate de soude est lente. Les bactéries de ce groupe cultivent sur le milieu de Koser-Simmons en cinq à six jours, alors que les *Aerobacter* typiques poussent en vingt-quatre heures. Dans ce groupe hétérogène on rencontre des germes attaquant la cellobiose (Jones, Wice, Barthy-Smith). D'après Barthy-Smith, *Aerogenes* n'attaque jamais la cellobiose, *Escherichia* donne 10 p. 100 de réactions positives et *intermediate* 33 p. 100.

#### CONSTITUTION ANTIGÉNIQUE. CLASSIFICATION.

On trouvera l'historique de ce paragraphe dans la monographie consacrée aux Entérobactéries pathogènes [12] ; nous n'y reviendrons pas ici. La classification actuelle des coliformes *Escherichia-Aerobacter* repose sur la connaissance de 3 constituants antigéniques : les facteurs K, O et H.

*Antigènes K.* — Kauffmann [4] spécifie que le terme antigène K n'est pas synonyme d'antigène capsulaire, comme on le pensa tout d'abord. Il faut envisager ce terme comme le symbole aussi bien des facteurs d'enveloppe que des facteurs capsulaires.

Ces facteurs d'enveloppe ou de surface sont de 3 types : L, A et B. L'antigène L, premier facteur d'enveloppe établi par Kauffmann, est thermolabile. Il masque l'agglutinabilité « O » des coliformes ; Kauffmann et Knipschildt en dissocient 24. Ces antigènes L sont détruits par un chauffage d'une heure à 100°.

L'antigène A fut, lui aussi, découvert par Kauffmann. Les bactéries dotées de ce facteur cultivent de façon singulière ; leurs colonies sur gélose sont denses, volumineuses, opaques, souvent mucoides. Si on laisse vieillir les cultures, on ne tarde pas à voir paraître des colonies secondaires, moins volumineuses, plus transparentes, dites « N » (Naked formes). Ces dernières sont, contrairement aux premières, dépourvues d'antigène A ; elles sont sensibles aux agglutinines « O ». Morphologiquement les coliformes de type A sont munis de capsules ; l'antigène A représente donc un antigène capsulaire vrai. Il ne peut être détruit que par un chauffage de deux heures à 120° (Vahlne). Kauffmann et Knipschildt ont enfin établi la présence d'un troisième facteur d'enveloppe sérologiquement différent de l'antigène L. C'est le facteur B, détruit à 100° au bout d'une heure.

Ainsi donc, le terme antigène A coiffe non pas un seul facteur antigénique, mais un ensemble de trois complexes : L, A et B, dont le type A est vraiment capsulaire. De ce dernier on a pu isoler des polysaccharides spécifiques. On peut, avec Kauffmann, résumer

les caractères des souches dotées de l'un ou de l'autre de ces facteurs :

## ANTIGÈNE L

Thermolabile.  
Variations rares.  
Responsable de l'O-inagglutinabilité de 80 p. 100 des souches.  
Antigène d'enveloppe, rarement capsulaire.  
Rare dans les groupes 8 et 9.  
Faible résistance aux agents variés.  
Plus grande toxicité pour la souris.  
Souvent hémolytique  
Assez fréquemment et fortement nécrotique.  
Plus grand pouvoir pathogène pour l'homme.

## ANTIGÈNE A

Thermostable.  
Variations fréquentes.  
Responsable de l'O-inagglutinabilité de 20 p. 100 des souches.  
Toujours capsulaire.  
Généralement chez les groupes 8 et 9.  
Forte résistance aux divers agents.  
Moins toxique pour la souris.  
Non hémolytique.  
Peu nécrotique.  
Moins pathogène pour l'homme.

Il importe de souligner que les souches dotées de l'antigène L sont plus pathogènes que celles appartenant au type A ou B. La présence d'un antigène K est signée par l'inagglutinabilité de la bactérie vivante par un sérum O spécifique et son agglutination par un sérum K préparé en injectant des bactéries vivantes au lapin.

Les souches L deviennent sensibles aux agglutinines O après un chauffage d'une heure à 100°. Les souches A ne deviennent agglutinables qu'après chauffage de deux heures à 120°.

Enfin on ne rencontre jamais plusieurs facteurs d'enveloppe chez une même bactérie. Toutes les souches étudiées par Kauffmann contenaient soit le facteur L, soit les facteurs A ou B ; il n'y avait jamais association de deux antigènes.

*Antigènes O.* — Les antigènes O des coliformes bien étudiés par A. Boivin et ses collaborateurs [13, 14] sont des complexes phospho-glucido-lipido-polypeptidiques. Ils sont thermostables. On les met en évidence sur des suspensions microbiennes préalablement chauffées à 120° pendant deux heures (élimination de l'antigène K). On pratique les agglutinations en tubes et à 56° (Kauffmann).

*Antigènes H.* — Ce sont des antigènes ciliaires. Les coliformes étant peu mobiles, leur appareil ciliaire reste toujours discret. Toutefois, en pratiquant des cultures en tubes en U sur gelose très molle (0,1 p. 100), Vahlne obtient des cultures très mobiles, riches en antigène H. Cet antigène H est facilement détruit par la chaleur et l'alcool. L'existence des antigènes K, O et H étant bien établie, on a pu classer les coliformes des genres *Escherichia-Aerogenes* en : 25 types O, 55 types K et 22 types H.

Sur ces données on a basé un tableau sérologique des coliformes tout à fait comparable à celui des Salmonelles. En résumé :

1° Il est possible de classer les coliformes en types sérologiques

par la seule considération de la mosaïque antigénique K, O et H. La majorité des souches pathogènes rentre dans les 25 types O de Vahlne. On les isole rarement des eaux ou du sol.

2° Il n'y a aucune correspondance entre les classifications biochimiques (*Escherichia*, *Aerobacter*, *Intermediate*) et la classification sérologique.

3° On ne peut pas établir de relation constante entre le type sérologique et le pouvoir pathogène. Toutefois, il faut souligner que certaines souches pathogènes appartiennent plus fréquemment à un type qu'à un autre. Les germes du type O : 8 sont fréquemment pathogènes ; cela ne veut pas dire cependant que toutes les bactéries de ce type sont dangereuses.

4° Le schéma d'ensemble publié par Kauffmann en 1947 [4] comprend 25 groupes de coliformes déterminés par leur caractère antigénique O ; les variétés en sont différenciées par les antigènes K dont on connaît 55 types et les antigènes H au nombre de 22. La formule antigénique d'un coliforme sera par exemple :

ANTIGÈNE O	ANTIGÈNE K	ANTIGÈNE H
2	1 L	7
9	26 A	10
9	55 A	"
10	5 L	4

Les groupes O les plus riches en espèces correspondent aux numéros : 2, 6, 8 et 9. Ces deux derniers groupes sont les plus importants. D'autres, comme les groupes 1, 10, 11, 12, 16, ne comprennent qu'une ou deux espèces. Le grand tableau de Kauffmann-Knipschild-Vahlne (1947) résume ce spectre sérologique des coliformes *Escherichia-Aerobacter*.

H. Mondolfo et Hounié (1948) [5] ont pu faire entrer dans cette classification la plus grande partie des souches isolées dans leur laboratoire de clinique. Ils ont insisté sur la complète indépendance des classifications sérologiques et biochimiques. Ne voit-on pas chez les *Salmonella* le groupe D englober des germes biochimiquement très différents comme *Salmonella typhi* ou bacille d'Eberth et le groupe des *enteritidis* ? La mosaïque antigénique est une chose, le caractère biochimique des bactéries en est une autre.

#### POUVOIR PATHOGÈNE.

Les coliformes du groupe *Escherichia-Aerogenes* sont souvent responsables de syndromes variés : infections subaiguës ou chroniques des tractus uro-génitaux, pyohémies, septicémies, syndromes gastro-intestinaux du nourrisson, syndromes entéro-rénaux, voire



même troubles nerveux, syndromes méningés. Kauffmann fait actuellement jouer aux coliformes un rôle important dans l'appendicite [15].

Chez les animaux de laboratoire les coliformes du groupe que nous étudions ne sont pratiquement pathogènes que pour la souris, à condition d'employer la voie péritonéale.

On a reconnu depuis longtemps l'existence d'une toxine colibacillaire (Malvoz, Gilbert, Boix, Vaughan, Besson et de Lavergne).

H. Vincent a montré que les coliformes sécrètent en réalité deux principes toxiques : une exotoxine neurotrope et une endotoxine entérotrope. Il a souligné l'indépendance d'action de ces deux poisons. Les anticorps dont ils provoquent l'élaboration dans l'organisme sont spécifiques. Les anti-endotoxines ne neutralisent pas les anti-exotoxines. Boivin et Mesrobian ont isolé l'endotoxine qui est de nature phospho-glucido-lipidique, tandis que l'exotoxine est de nature protéique. On base, à l'heure actuelle, le pouvoir pathogène des coliformes sur leur activité vis-à-vis des globules rouges et leur toxicité pour l'animal.

Les études effectuées sur le pouvoir hémolytique des coliformes sont nombreuses : Jacobitz et Kayser, Dudgeon, Wordley et Bawtree, Jansen, Den Dooren de Jong, Tanner, Walker L. Lowing, ont tous signalé la fréquence des souches hémolytiques dans les syndromes urinaires ou dans les intoxications alimentaires (Tanner). Kauffmann a complété ces études en recherchant non seulement le pouvoir hémolytique des coliformes, mais en outre leur pouvoir hém-agglutinant. Le test proposé par Kauffmann est très simple.

Sur une lame bien propre on pose 1 goutte de suspension d'hématies à 10 p. 100 dans le sérum physiologique. Dans cette goutte on émulsionne une ose de culture de vingt heures sur gélose du germe à étudier. On voit dans les secondes suivantes s'il y a — ou non — agglutination des hématies. On peut lire la réaction à l'aide d'une loupe grossissant huit fois.

Kauffmann a fait agir ses souches sur des hématies de poule, de lapin, de cheval, de cobaye et d'homme. Il souligne que les caractères hémolytique et hém-agglutinant ne coïncident pas toujours. Les facteurs K et H prennent ici une certaine importance. Des souches appartenant à un même type O (4, 6 ou 9 par exemple) ont un comportement variant avec la nature de leurs antigènes K ou H. On voit ainsi que les souches 4 : 3 L : 5 et 4 : 3 L ont des caractères tout à fait opposés. Les deux souches sont hémolytiques, mais tandis que la première agglutine toutes les hématies qu'on lui présente, la seconde reste complètement indifférente. La souche 6 : 13 L : 1 est à la fois hémolytique et hém-agglutinante ; sa voisine, par contre, 6 : 13 L, qui ne possède pas d'antigène H, n'est pas hémolytique ; elle n'agglutine

**Exemples d'action de quelques coliformes sur les hématies  
(d'après Kauffmann).**

ANTIGÈNES			HÉMOLYSE	HÉMOAGGLUTININES				
O	K	H		pour poule	pour lapin	pour cheval	pour cobaye	pour homme
4	3 L	5	+	+	+	+	+	+
4	3 L		+	—	—	—	—	—
4	12 L	5	+	+	(+)	(+)	+	+
4	12 L		+	+	(+)	(+)	+	+
6	13 L	1	+	+	+	+	+	+
6	13 L		—	(+)	—	—	—	—
6		10	+	+	+	+	+	(+)
9	9 L	12	—	+	+	+	+	+
9	26 A	10	—	—	—	—	—	—
9	26 A		—	—	—	—	—	—

que faiblement les hématies de poule ; elle n'a aucune action sur les autres hématies.

Les coliformes hémagglutinants appartiennent le plus souvent aux groupes 0 : 4 et 0 : 6. Les souches hémolytiques sont de préférence hémagglutinantes, nécrosantes et toxiques pour la souris. Les souches non hémolytiques sont rarement hémagglutinantes, peu nécrosantes et faiblement toxiques pour la souris. Mais il ne faut pas faire de ces données une règle absolue (Kauffmann). Kauffmann et Vahlne ont insisté sur la fréquence des souches hémolytiques et nécrosantes dans les appendicites. Les groupes sérologiques les plus fréquemment rencontrés dans ces cas portent les nos 1, 2, 4, 6, 8, 9, 18, et 21. Les caractères des souches isolées des appendices malades sont : l'inagglutinabilité 0, l'hémolyse, l'hémagglutination, le pouvoir nécrotique et la toxicité pour la souris.

#### LE GENRE *KLEBSIELLA*.

Les tests cardinaux de l'IMVIC permettent de définir un troisième genre de coliformes : les *Klebsiella*. Ce sont des coliformes immobiles, capsulés, donnant des cultures muqueuses. On envisage, là encore, un certain nombre d'espèces caractérisées par les tests secondaires résumés au tableau II. Le germe décrit par Friedländer en 1882 est le chef de file de ce genre. Considéré au début comme responsable de la pneumonie, on l'a rencontré depuis au cours de multiples infections du rhino-pharynx, dans

des lésions suppuratives, des pleurésies, des cystites, pyélonéphrites, endométrites, abcès du cerveau. On le trouve dans des selles de sujets normaux ou de malades. La capsule dont sont très souvent, mais non constamment, pourvues les *Klebsiella* est, d'après Tœniessen et Kramer, de nature polysaccharidique à base de galactose. Heidelberger, Goebel et Avery ont précisé, en 1925, que ce polysaccharide contient aussi du glucose, tout au moins dans le cas de *Kl. pneumoniae*.

Au point de vue biochimique, l'attaque du lactose, du glucose, de l'adonitol, de l'inositol, l'absence de production d'indole et d' $H_2S$  constituent les caractères les moins variables des *Klebsiella*. Pour Kauffmann un certain nombre de souches hydrolysent l'urée. Il faut insister sur le fait que cet auteur suit la réaction pendant quatre jours à  $37^\circ$ . Si l'on réduit ce temps à vingt-quatre heures, en milieu rigoureusement défini, comme nous l'avons précisé [8], aucune souche de *Klebsiella* n'attaque l'urée.

Enfin, à de très rares exceptions près, les *Klebsiella* ne sont ni hémolytiques, ni hémagglutinantes.

#### TABLEAU II.

##### Genre *Klebsiella* :

Cultures muqueuses : germes le plus souvent capsulés.

M : le plus souvent +.

V : 0.

C : en général +.

Lait acidifié. — Non coagulé spontanément :

- |                           |  |
|---------------------------|--|
| a) Maltose : —.           | } <i>Kl. pneumoniae</i> (Friedländer). |
| Mannite : —.              |  |
| b) Maltose et mannite : + | <i>Kl. ozenae</i> .                    |

Lait coagulé : *Kl. granulomatis*, *Kl. capsulata* et *Kl. paralytica*.

Lait inchangé : *Kl. rhinoscleromatis*.

#### STRUCTURE ANTIGÉNIQUE.

Les premières recherches effectuées sur cette question remontent aux travaux de Porge (1905). Vinrent ensuite celles de Streit (1906), de Small et Julianelle, Avery, Heidelberger et Julianelle. On distingue trois types sérologiques déterminés par la spécificité de leur composition capsulaire, comme chez les pneumocoques. Julianelle décrivait des types A, B et C assez bien individualisés et un quatrième : X hétérogène. Le polysaccharide du groupe A contenait un acide aldobionique à base de glucose et d'acide glucuronique. Chez le type B on signalait une communauté antigénique avec le pneumocoque de groupe II.

L'école danoise a repris pour les *Klebsiella* ce qu'elle avait réussi pour le groupe *Escherichia-Aerogenes*. Kauffmann a montré que le comportement sérologique des *Klebsiella* ne dépend pas

seulement des facteurs capsulaires, mais aussi de l'antigène O. La mosaïque antigénique des *Klebsiella* nous offre donc : un antigène K, un antigène O et l'antigène R des souches non capsulées (nucléoprotéine). Les deux premiers facteurs jouent un rôle décisif dans la détermination des groupes sérologiques. Ces antigènes coexistent chez une même bactérie dans des proportions variables. Kauffmann résume ces possibilités dans le tableau suivant :

I. — *Formes S (lisses)* :

1° MKO : Muqueuses, capsulées . . . . .	Antigène O.
2° KO : Non muqueuses, capsulées . . . . .	Antigène O.
3° MO : Muqueuses, non capsulées . . . . .	Antigène O.
4° O : Non muqueuses, non capsulées . . . . .	Antigène O.

II. — *Formes R (rugueuses)* :

1° MKR : Muqueuses, capsulées . . . . .	Pas d'antigène O.
2° KR : Non muqueuses, capsulées . . . . .	Pas d'antigène O.
3° MR : Muqueuses, non capsulées . . . . .	Pas d'antigène O.
4° R : Non muqueuses, non capsulées . . . . .	Pas d'antigène O.

On trouve l'antigène R chez toutes les espèces, mais il est masqué dans les formes lisses par la présence de l'antigène O.

Kauffmann (1949) distingue trois types O de *Klebsiella* qu'il nomme O1, O2 et O3. Il a pu identifier 14 variétés d'antigènes capsulaires, ce qui lui permet de dresser un tableau sérologique du genre *Klebsiella*. Le groupe O1 englobe les types capsulaires : 1, 2, 3, 7, 8, 10 et 12. Dans le groupe O2 on trouve les types capsulaires 2, 3, 4, 6 et 8, etc. On peut donc définir les *Klebsiella* par leur type sérologique et parler : de *Klebsiella* 1 : 1 ; 1 : 2 ; 3 : 11, etc., le premier chiffre indiquant le type O, le second le type K.

Kauffmann souligne que l'antigène O du groupe 1 est identique à l'antigène *Escherichia* O du groupe 19 b ; l'antigène *Klebsiella* O3 est identique à l'antigène *Escherichia* O9. De même l'antigène K10 des *Klebsiella* est identique au K39 des *Escherichia*.

**POUVOIR PATHOGÈNE.** — Les travaux les plus récents (Kauffmann) ont montré que les germes isolés des infections urinaires appartiennent dans 90 p. 100 des cas aux types capsulaires 8, 9 et 10. Ils ne sont pas virulents pour la souris. Les souches isolées au cours des infections respiratoires appartiennent aux types K1 et K2. Elles sont en général virulentes pour la souris.

GROUPE ALCALESCENS-DISPAR.

La place actuelle de ce groupe de germes est proposée depuis peu (1949). Ces Entérobactériacées appartenaient, jusqu'à ces der-



niers temps, à la tribu des *Shigella*. Pour Kauffmann [1] ces germes immobiles, souvent anaérogènes et lactose-négatifs (ou tardivement positifs) doivent entrer dans la tribu des *Escherichia*. Sérologiquement ils se classent fréquemment dans les groupes O : 1, 3, 4, 9 et 25 des *Escherichia*. Certaines souches contiennent des antigènes K, en particulier le facteur L1. Les souches que décrit Brauer sous le nom de Flexner « Clark » et « Ustun » ne seraient que des *Escherichia* du groupe O.25 dotées d'antigène L1.

Parmi ces germes, certains sont hémolytiques et hémagglutinants (Kauffmann, 1950).

La position des groupes *Alcalescens-dispar* fait l'objet d'études nouvelles. On trouvera le détail de leurs caractères biochimiques dans les traités classiques et dans les monographies. *Shigella alcalescens* a servi de thème à l'excellente thèse de F. Roland en 1946 (2). Toutefois le groupe *Alcalescens-dispar* vient d'être révisé par Frantzen [27], qui en dissocie 8 groupes sérologiques établis d'après leur comportement en présence de sérums agglutinants O anti-*Escherichia*.

Ce groupe comprend, en somme : des bacilles Gram-négatifs, immobiles, dont voici les caractères essentiels : culture sur ammonium-glucose ; pas de culture sur citrate ; fermentation sans gaz du mannitol et du glucose. Production d'indole : réduction des nitrates ;  $M = +$  ;  $H_2S = O$  ; gélatine non liquéfiée. Uréolyse négative. V. P. = O ; adonitol et inositol : non attaqués ; action variable sur le lactose : *Alcalescens* II et III de de Assis fermentent ce sucre ; *Dispar* I et III également ; *Alcalescens* I est sans action.

#### LES PARACOLONS.

Il nous a paru facile de définir les coliformes typiques. Leur attaque franche du lactose n'autorise aucune hésitation. Il faut envisager maintenant un très vaste groupe d'Entérobactériacées, difficile à limiter tant les individus qu'on y place sont capricieux dans leur comportement biochimique. Ce groupe est celui des Paracolons ou *Paracolibactrum*.

Besson le considérerait comme une source de confusion. Si on l'admet, on y range toutes les Entérobactériacées qui semblent faire la transition entre des *Coliformes*, les *Salmonella* et les *Shigella*.

Pour Trawinski (1924) la production d'indole, la fermentation du glucose, l'attaque du mannitol et du maltose constituaient les caractères les plus constants des paracolons. Sandiford insistait

(2) F. ROLAND, Thèse Méd. Paris, 1946.

en 1935 sur l'inconstance de l'attaque du lactose par les paracolons. Ces germes, en raison même de leur ubiquité, ont fait l'objet de nombreuses discussions et interprétations. Edwards et ses collaborateurs [22] en ont commencé l'étude sérologique ; Borman, Stuart et Wheeler en 1944 ont défini le groupe « *Paracolobactrum* » dans lequel ils différencient trois genres : *aerogenoides*, *intermedium* et *coliforme*. On reconnaît sans peine l'analogie de cette systématique avec celle que l'on adopte pour les coliformes. Là encore l'IMVIC de Parr sert de fil conducteur pour séparer les espèces. Une revue générale des paracolons a été faite par R. Buttiaux et A. Kesteloot en 1948 [6]. Depuis ces travaux, ce groupe de germes vient d'être l'objet de remaniements importants :

Kauffmann estime qu'il faut reclasser les bactéries décrites sous l'étiquette « paracolons ». Il préfère en reformer des groupes que l'on engloberait dans la tribu des *Salmonellae*. Cet auteur, comme le souhaitait Besson, cherche à éviter cette tribu « paracolon » où, il faut bien l'avouer, on tend à placer tous les germes atypiques de diagnostic difficile. Nous soulignons donc que ce que nous dirons des paracolons n'est que transitoire et devra être révisé d'ici peu de temps sans doute ; ce groupe est, une fois de plus, appelé à disparaître de nos classifications. Il faut reprendre l'étude des bactéries que l'on y plaçait pour en refaire des groupes mieux individualisés, proches parents des *Salmonella* : nous pensons spécialement aux groupes *arizona*, *ballerup*, *bethesda* dont certaines souches attaquent lentement le lactose, mais qui, sérologiquement, sont incontestablement des *Salmonella*. Nous en dirons quelques mots dans un instant.

La morphologie de ces germes n'offre rien de spécial. Il faut insister cependant sur la fréquence des formes mobiles ; et c'est là un caractère qui les rapproche encore des *Salmonella*.

Le caractère essentiel des paracolons, celui-là même qui servait de base à leur définition, est l'irrégularité de leur action sur le lactose :

Certaines souches attaquent ce sucre en deux jours, d'autres en trente jours. Beaucoup d'espèces ne fermentent pas du tout ce glucide, même après trente jours d'étuve à 37°. Il est évidemment assez périlleux de vouloir baser une classification sur un caractère aussi inconstant.

Les paracolons attaquent constamment le glucose, le mannitol et le maltose. Ce ne sont pas, là non plus, des épreuves bien différentielles. Toutes les variétés donnent de l'H<sub>2</sub>S et réduisent le bleu de méthylène. Enfin Chilton et Fulton insistent sur le fait que les paracolons fermentent toujours l'adonitol, l'esculine ou le saccharose, contrairement aux *Salmonella* authentiques. Il faut reconsidérer ces épreuves. Buttiaux et Kesteloot décrivent des

souches capables de liquéfier lentement la gélatine et hydrolysant l'urée. Nous n'avons jamais rencontré cette éventualité dans les conditions d'expérience que nous avons définies [8]. Il semble qu'il serait utile, pour ces recherches, de partir de cultures rigoureusement pures, obtenues d'une seule bactérie ; le micro-manipulateur permet l'obtention de ces cultures. Il est possible, en effet, que les cultures de bactéries atypiques soient en fait des mélanges de germes pratiquement impossibles à séparer par les techniques habituelles. La présence de quelques *Proteus* dans une culture peut fort bien expliquer ces réactions atypiques tardives que l'on prête à des paracolons.

CONSTITUTION ANTIGÉNIQUE. — Dans certains cas on se trouve en présence de germes dotés d'antigène O, H et K. Il fut possible de grouper les paracolons en types sérologiques absolument indépendants des types biochimiques. Schwabacher (1949) a déterminé les antigènes somatiques de 65 p. 100 des souches qu'il a étudiées et les antigènes flagellaires de 52,2 p. 100. Deux souches sur 90 possédaient l'antigène Vi de *Salmonella typhi* [17].

En fait, beaucoup de ces paracolons peuvent entrer dans les groupes ou tribus des *Salmonellae* ou des Coliformes, parfois même des *Shigella*. Il est certain que l'on parviendra petit à petit à reclasser plus correctement la plupart de ces germes aberrants.

#### RÔLE DES COLIFORMES EN ÉPIDÉMOLOGIE.

Les germes responsables des maladies dites « hydriques » sont souvent difficiles à isoler du milieu extérieur. Pour cette raison, on a depuis longtemps considéré la présence de coliformes dans un aliment ou une eau de boisson comme le meilleur indice d'une souillure fécale. Hygiénistes et bactériologues ont recherché des tests précis pour dépister ces coliformes d'origine fécale (Winslow, Rogers, Clark, McConkey, Evans, etc.). Les études actuelles ne confirment pas la valeur de ces tests.

Il est clairement établi maintenant que l'on peut rencontrer tous les types de coliformes dans l'intestin de l'homme sain ou malade et dans les divers produits pathologiques. Certaines espèces sont beaucoup plus fréquentes que d'autres, mais, comme nous l'avons montré avec E. Magrou [3], *Aerobacter* est présent cependant dans près de 30 p. 100 des produits pathologiques ou des selles. Il est donc tout aussi inquiétant qu'*Escherichia*, si on le rencontre dans une eau de boisson.

Une catégorie de germes appartenant aussi bien au groupe coliforme qu'au groupe paracolon, se montre sensible aux agglutinines anti-*Salmonella* et anti-*Shigella*.

Signalées en 1925 par Habs et Arjona, ces bactéries ont été de

nouveau étudiées par Gard et Erikson, Borstein, Saphra et Daniels, Kauffmann, Edwards et Brunner, Buonomini et d'Alessandro et leurs collaborateurs [18], Buttiaux et Kesteloot [20], J. Brisou [7].

En 1941, Kauffmann classait 5 coliformes dans la tribu des Salmonelles sous les noms de *Salmonella coli* 1, 2, 3, 4 et 5. Il faut souligner que ces germes ne figurent plus dans le dernier tableau des Salmonelles.

Les travaux de l'école italienne sous la direction de G. d'Alessandro et de G. Buonomini ont particulièrement contribué à l'intérêt épidémiologique de cette importante question. Nous avons encore insisté récemment sur l'intérêt de ces coliformes agglutinés par les sérums spécifiques anti-*Salmonella* [19].

On rencontre assez fréquemment *Salmonella coli* dans les selles de sujets convalescents d'infections typho-paratyphoïdiques et dans les eaux polluées des régions endémo-épidémiques. En Italie les coliformes de ce groupe se rapprochaient le plus souvent de *Salmonella onderstepoort*. Les souches que nous avons étudiées en Tunisie avaient fréquemment une parenté sérologique avec le groupe des *paratyphosus* C (antigènes VI). En France, nous avons rencontré des coliformes pourvus d'antigène Vi et d'antigène IV-(paratyph. B), mais beaucoup plus rarement qu'en Tunisie.

Ces coliformes ont un intérêt épidémiologique ; on doit mettre à l'écart les sujets qui en hébergent. Sans entrer dans des considérations plus ou moins hypothétiques sur la genèse et le devenir de ces bactéries, il suffit à l'épidémiologiste de savoir qu'on les rencontre surtout chez les convalescents et dans l'entourage immédiat des sujets atteints d'infections typho-paratyphoïdiques.

Stones, Doris et Taylor ont identifié une *Salmonella coli* agglutinable par le sérum anti-onderstepoort au cours d'une épidémie d'intoxication alimentaire, dont une crème au chocolat fut reconnue responsable. Le germe lactose-positif était toxigène [21].

Edwards [22] a relaté des épidémies de gastro-entérite provoquées par des coliformes sérologiquement parents des Salmonelles. Nous en avons également rapporté un cas particulièrement typique [23] dû à *Salmonella coli* possédant l'antigène VI.

On comprend alors l'intérêt de ces bactéries et la nécessité de soumettre les coliformes qui paraissent les plus typiques et les plus banaux à l'action des sérums agglutinants T.A.B. et C ou anti-*Shigella* polyvalents.

#### LES GROUPES ARIZONA-BALLERUP-BETHESDA.

Cette revue d'ensemble oblige à considérer rapidement ces groupes d'Entérobactériacées. Beaucoup de ces germes ont été



considérés comme proches parents des coliformes et classés parmi les paracolons ou très près d'eux. Pour Kauffmann [4] ils rentrent indiscutablement dans la tribu des *Salmonellae*, constituée elle-même de quatre groupes : *Salmonella*, *Arizona*, *Bethesda* et *Ballerup*.

Ces groupes sont suffisamment bien individualisés biochimiquement et sérologiquement pour justifier cette conception. « De cette façon, souligne Kauffmann, on évite la tribu spéciale des *Paracolobactrum*... » Il n'y a donc plus lieu d'étudier ces Entérobactériacées dans le chapitre des coliformes, malgré l'attaque lente du lactose par certaines espèces. Sérologiquement et par bien d'autres caractères on doit classer ces groupes dans les *Salmonellae*.

Il faut insister sur le fait qu'entre les tribus et entre les genres d'Entérobactériacées, il est difficile de tracer des frontières précises. Il n'y a pas d'hiatus. On passe d'une tribu à une autre, d'un genre à l'autre par une série d'intermédiaires, formes sans doute adaptatives que l'on saisit tout à fait fortuitement au cours de leur cycle ; on les retrouve avec une fréquence variable soumise aux conditions de milieu, aux conditions épidémiologiques, aux influences favorables ou antagonistes, dont beaucoup nous échappent encore. Ces groupes *arizona*, *ballerup* et voisins donnent un reflet de la variabilité de cette flore dont on peut extraire çà et là quelques chefs de file qui nous guident et servent de points de repère.

#### L'ANTIBIOSE CHEZ LES COLIFORMES.

Des travaux nombreux, dont Fredericq vient de donner une remarquable vue d'ensemble [25], ont montré l'activité antibiotique de certains coliformes sur d'autres germes et spécialement sur d'autres Entérobactériacées. Le phénomène revêt ici, par son ampleur, un intérêt particulier. En 1925, Gratia attira l'attention sur l'activité d'une souche de coliforme isolée du cœur d'un lapin. Cette souche dite « V » lysait une autre souche de coliforme qui fut appelée «  $\phi$  ». Gratia montra que la souche V sécrétait un principe actif à  $10^{-3}$ , résistant à  $100^\circ$ , dialysable, précipitable par l'acétone, diffusible, non antigénique. Ce fut le principe V de Gratia.

Fredericq a montré, au cours de ces dernières années, qu'un certain nombre d'Entérobactériacées sécrètent des principes antibiotiques. Avec Gratia il appelle « Colicines » ces nouveaux antagonistes microbiens dont la spécificité dépend des souches productrices. On dénombre actuellement 17 colicines ; ces substances diffèrent des principes responsables de la vaccination des milieux de culture, et du bactériophage.

Les souches productrices de colicine sécrètent un ou deux principes antibiotiques, dont l'activité peut s'étendre à un grand nombre d'espèces. Sur 881 souches d'Entérobactériacées étudiées par Fredericq, 411, soit près de 50 p. 100, furent sensibles à l'action de la colicine V. Les germes les plus facilement attaqués par les colicines appartiennent aux *Shigella* ; viennent ensuite les *Escherichia*, les *Paracolons*, les *Salmonella*, les *Proteus* et l'*Aerobacter*.

Les Entérobactériacées peuvent acquérir une certaine résistance aux colicines grâce à un mécanisme de mutation spontané. On assiste alors à une sélection de types mutants résistants aux colicines. Fredericq pense que cette action des colicines s'exerce surtout dans le sein de la famille des Entérobactériacées. Il existe même un phénomène d'isoantibiose ; certaines *Escherichia* agissent électivement sur d'autres *Escherichia* ; des *Shigella* s'attaquent de préférence à d'autres *Shigella*, etc.

Il a fallu donner un indicatif à ces diverses colicines. On distingue à l'heure actuelle :

Une colicine A, sécrétée par *E. freundii*. Elle passe souvent dans les urines des sujets atteints de typhoïde (Fredericq et Betz, Barreau, 1948).

Des colicines B, C, D, E, F, G, H, I et V, qui sont élaborées par les *Escherichia*.

Les paracolons produisent les colicines J et K.

Quelle est exactement la nature de ces substances ? Nous n'en savons encore que peu de chose.

Les coliformes, comme on le voit, nous offrent de multiples sujets d'étude. Nous avons insisté sur les variétés biochimiques. On connaît la gamme étendue des glucides qu'ils attaquent, et avec quelle fantaisie parfois ! Si l'on se tourne vers leur mosaïque antigénique, on ne peut qu'être frappé de sa richesse. A ces propriétés si variées vient s'ajouter la sécrétion de principes antibiotiques. Jusqu'ici 17 substances différentes ont été soupçonnées.

Nous avons là un reflet remarquable de la plasticité de la cellule bactérienne constamment obligée de s'adapter au milieu dans lequel elle se trouve. Parmi les coliformes il en est de pathogènes, mais il en est aussi d'indispensables. Les actions antagonistes qu'ils exercent les uns sur les autres sont certainement pour beaucoup dans le maintien de l'équilibre microbien de l'intestin.

#### CONSIDÉRATIONS MÉDICALES.

Toutes les données théoriques que l'on vient d'exposer ne sont pas sans intérêt pratique :

Le diagnostic d'un coliforme doit être aussi poussé que possible.

Aux caractères biochimiques essentiels (IMVIC) il semble indispensable de joindre certains caractères sérologiques, les propriétés hémolytiques et hémagglutinantes. Il est utile de préciser la présence possible d'antigènes communs avec les *Salmonella* ou les *Shigella*. Nous en avons souligné l'intérêt épidémiologique.

Les antibiotiques constituent, à l'heure actuelle, les moyens thérapeutiques les plus puissants que l'on puisse opposer aux infections colibacillaires dont on connaît la ténacité souvent désespérante. Streptomycine, et surtout : Chloromycétine et Auréomycine sont des armes de choix. Mais là encore on rencontre des souches résistantes. Si certaines succombent *in vitro* à 1 gamma de chloromycétine, il en est d'autres que le milligramme laisse indifférentes. On complètera donc l'analyse bactériologique par le spectre de sensibilité aux antibiotiques courants. On évitera, pour le médecin traitant, une perte de temps et, pour le malade, une sérieuse économie en plus d'un soulagement rapide.

Dans le cas où l'on trouvera un germe insensible aux antibiotiques, l'antigénothérapie pourra donner des succès indiscutables. On s'adressera aux auto-vaccins préparés en faisant agir l'alcool à 75° (méthode de Felix) sur une culture fraîche de germes, ainsi que nous l'avons précisé antérieurement [26]. Cette antigénothérapie sera guidée par les données tout à fait classiques : les petites doses répétées immunisent mieux que les fortes doses. On vaccinera donc en injectant des quantités minimales : 1/10 à 1/30 de centimètre cube espacées de cinq à six jours. Ces injections seront pratiquées dans le derme, dans des régions peu éloignées de territoires ganglionnaires. Cette technique évite les chocs et les réactions violentes, tout en reflétant la susceptibilité du malade à l'antigène.

Après ce que nous avons dit de la diversité sérologique des coliformes, on comprendra aisément que les auto-vaccins puissent prévaloir sur les stock-vaccins.

#### CONCLUSIONS.

Le chapitre des coliformes est en remaniement permanent. On a cherché dans ces quelques pages, encore trop incomplètes, à présenter au lecteur les principaux problèmes que pose cette tribu aux bactériologues. Actuellement on envisage la tribu comme divisible en 4 groupes : *Escherichia*, *Alcalescens-dispar*, *Klebsiella* et *Serratia*.

Nous avons laissé de côté le groupe *Serratia*, sans intérêt médical actuel et classé par R. Prévot dans les *Pseudomonadaceae*.

Le praticien est évidemment peu familiarisé avec les modifica-

tions survenues au cours de ces dernières années dans des conceptions considérées comme classiques. Et cependant il est chaque jour aux prises avec des infections colibacillaires.

Il faut souligner l'extrême diversité des coliformes. Les notions de bactériologie pure ont reçu des applications thérapeutiques et épidémiologiques intéressantes.

La colibacillose, affection tenace, peut être combattue grâce à un traitement rationnel. On ne peut y atteindre sans le secours d'un laboratoire averti qui donnera au clinicien tous les caractères du coliforme isolé. On ne doit pas se contenter du simple « Colibacille » que l'on voit trop souvent figurer dans les réponses de laboratoire.

L'hygiène tire aussi bénéfice des données théoriques. La sérologie donne des renseignements utiles.

Ainsi donc les magnifiques recherches effectuées par les bactériologues, les biochimistes et les sérologistes, si longues et si patientes, ne doivent pas rester inutiles. C'est pour les appliquer et leur rendre hommage qu'il importe de les faire connaître.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] KAUFFMANN. *Acta Path. et Microb. Scand.*, 1950, **27**, 300.
- [1 bis] BRISOU (J.). *Arch. méd. Nav.*, 1935, **425**, 43.
- [2] BRISOU (J.). *Cahiers méd. Un. Fr.*, janvier 1948.
- [3] BRISOU (J.) et MAGROU (E.). *Ces Annales*, 1947, **73**, 290 et 292.
- [4] KAUFFMANN. *J. Immunol.*, 1947, **57**, 71.
- [5] MONDOLFO (H.) et HOUNIÉ (H.). *Igiene e Sant. Publ.*, 1948, **4**, 5.
- [6] BUTTIAUX (R.) et KESTELOOT (A.). *Ann. Inst. Pasteur de Lille*, 1948, **4**, 163.
- [7] BRISOU (J.). *Ces Annales*, 1950, **78**, 422.
- [8] BRISOU (J.). *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1949, **31**, 1656.
- [9] CHRISTENSENS (Bl.). *J. Bact.*, 1946, **52**, 461.
- [10] FERGUSON et HOOK. *J. Lab. Clin. Med.*, 1943, **28**, n° 14.
- [11] RUSTIGIAN et STUART. *J. Bact.*, 1945, **5**, 419.
- [12] BRISOU (J.). *Entérobactéries Pathog.*, 1946. 1 vol., Masson, Paris, 1946.
- [13] BOIVIN (A.), CORRE (L.) et LEHOULT (Y.). *C. R. Soc. Biol.*, 1942, **436**, 257.
- [14] BOIVIN (A.), CORRE (L.) et LEHOULT (Y.). *C. R. Soc. Biol.*, 1942, **436**, 257.
- [15] KAUFFMANN et VAHLNE. *Acta Path. et Microb. Scand.*, 1944, supp. **54**, 180.
- [16] STUART, BAKER, ZIMMERMAN, BROWN et STONE. *J. Bact.*, 1940, **40**, 101.
- [17] SCHWABACHER (J.). *J. Hyg.*, 1949, **47**, 115.
- [18] BUONOMINI et D'ALESSANDRO. *Boll. Soc. Ital. mic.*, 1941.
- [19] BUONOMINI et D'ALESSANDRO. *Ist. d'Ig. e Microb. Un. Palermo*, 1945, **4**, 1.



- [20] BUTTIAUX (R.) et KESTELOOT (A.). *Ces Annales*, 1948, **74**, 429.
- [21] STONE, DORIS et TAYLOR. *Bull. Hyg.*, 1944, **19**, 556.
- [22] EDWARDS. *J. Bact.*, 1945, **49**, 513.
- [23] BRISOU (J.). *Cahiers méd. Un. Fr.*, février 1948.
- [24] BUTTIAUX (R.) et KESTELOOT (A.). *Ces Annales*, 1948, **74**, 429 et **75**, 379.
- [25] FREDERICQ (P.). *Rev. Belge Path. Méd. exp.*, 1948, **19**, suppl. IV.
- [26] MAGROU (E.) et BRISOU (J.). *Bull. Soc. Méd. Hôp. Paris*, novembre 1946.
- [27] FRANTZEN. *Acta Path. et Microb. Scand.*, 1950, **27**, 237.

# INFLUENCE DU FACTEUR LUMIÈRE SUR LE TEMPS D'INCUBATION DE LA MOSAÏQUE DU TABAC

par D. SCHWARTZ et J. CUZIN (\*).

(Service des Recherches biologiques du S. E. I. T. A.)

Lorsqu'on inocule au Tabac le virus de la Mosaïque, le temps d'incubation varie notablement d'une expérience à l'autre : de quelques jours à plus d'un mois.

Cette variabilité a depuis longtemps attiré l'attention des pathologistes, qui l'ont d'abord attribuée à une variabilité de l'agent virus, ou à une variabilité génétique de l'hôte Tabac. Toutefois, dès 1932, Holmes [1] montrait nettement que le temps d'incubation est d'autant plus petit que la vitesse de croissance de la feuille inoculée est plus grande, de sorte que la variabilité des temps d'incubation peut être expliquée par la seule variabilité des caractères fluctuants de l'hôte, ou encore par la variabilité des conditions de milieu où croît le génotype.

Bien entendu, l'existence d'une corrélation entre vitesse de croissance et temps d'incubation n'implique pas l'existence d'une relation causale, et Holmes en donnait lui-même la preuve : lorsqu'il plaçait à l'obscurité les feuilles inoculées, leur vitesse de croissance était considérablement réduite, et cependant le temps d'incubation n'était presque pas modifié.

Le résultat ainsi mis en évidence (action pratiquement négligeable du facteur lumière sur le temps d'incubation) était également obtenu par Caldwell [2].

Cependant, au cours de nos propres recherches, nous avons constaté comme Holmes que la variabilité des temps d'incubation peut être expliquée à partir des caractères fluctuants de l'hôte (1), mais une analyse factorielle plus poussée nous a conduits à penser que le facteur lumière pourrait avoir une influence sur le temps d'incubation s'il intervenait dans des conditions convenables, et qu'en particulier le résultat pourrait être différent selon qu'il intervient *avant* ou *après* l'inoculation.

(\*) Société Française de Microbiologie, séance du 4 mai 1950.

(1) Travail en cours.

Nous avons donc étudié, au cours de l'été 1949, l'influence du facteur lumière sur le temps d'incubation.

### I. — MATÉRIEL ET MÉTHODES.

Nous avons utilisé comme hôte la variété *Nicotiana tabacum* L. Var. P 19 Berg., génotype isolé et suivi à l'Institut des Tabacs, et comme virus une souche banale du virus de la Mosaïque N.V.I.

Le facteur lumière fut envisagé sous deux aspects extrêmes « lumière » et « obscurité », et uniquement dans son incidence sur la feuille d'inoculation. Il s'agissait de plantes de plein champ dans les conditions normales de culture et d'ensoleillement ; dans les catégories « lumière », la feuille d'inoculation était soumise à des conditions normales d'ensoleillement, tandis que dans les catégories « obscurité » la feuille d'inoculation était enfermée dans un sac en papier d'aluminium (2).

La lumière ou l'obscurité portait sur une période, soit antérieure, soit postérieure à l'inoculation :

a) Dans le cas des « *pré-traitements* obscurité », les sacs furent mis en place six jours avant l'inoculation et retirés immédiatement après celle-ci ;

b) Dans le cas des « *post-traitements* obscurité », les sacs furent mis aussitôt après l'inoculation et laissés en place jusqu'à leur chute spontanée (provoquée par la croissance des feuilles aussi bien que par les intempéries) ; la durée de cette phase, variable par conséquent d'une plante à l'autre, fut en moyenne de huit jours.

Les « pré » ou « post » traitements lumière ou obscurité déterminaient 4 catégories de plantes, figurées ci-dessous :

CATÉGORIE	TRAITEMENT avant inoculation (« pré-traitement »)	TRAITEMENT après inoculation (« post-traitement »)
L.L. . . . .	Lumière.	Lumière.
L.O. . . . .	Lumière.	Obscurité.
O.L. . . . .	Obscurité.	Lumière.
O.O. . . . .	Obscurité.	Obscurité.

L'expérience porta sur 144 plantes, parmi lesquelles les 4 catégories ci-dessus furent réparties de la manière suivante :

(2) Bien entendu, la mise sous sac a amené d'autres modifications que celle du facteur lumière. Mais celle-ci est de beaucoup la plus importante.

les 144 plantes constituèrent 3 blocs de 48 plantes, à l'intérieur desquels chaque catégorie porta sur une série de 12 plantes, les 4 séries étant randomisées à l'intérieur de chaque bloc.

L'inoculation eut lieu sur les 144 plantes dans des conditions aussi standardisées que possible : même jour d'inoculation, même opérateur, même feuille d'inoculation (feuille n° 16 repérée depuis les cotylédons par des marquages successifs), même point d'inoculation (point situé, sur le côté droit de la feuille, entre la première et la deuxième nervure à partir de la pointe), même méthode d'inoculation : rotation d'un tour d'une baguette de verre ayant une tête aplatie et dépolie, à raison d'une baguette par feuille, et l'opérateur prenant soin de ne toucher la plante en aucun autre point que celui de l'inoculation.

La suspension de virus était additionnée de carborundum, et sa concentration suffisante pour que dans les conditions d'inoculation définies ci-dessus nous obtenions pratiquement 100 p. 100 de malades parmi les pieds inoculés de la catégorie témoin (L. L.).

Après l'inoculation, des relevés de maladie furent effectués régulièrement, tous les jours pendant les douze premiers jours, puis tous les deux jours et finalement plus espacés. La plante était considérée comme malade à l'apparition du « green mottle » sur les feuilles jeunes (3), et le temps d'incubation fut évalué par moyenne entre le dernier jour où la plante était encore saine et le premier jour où elle était déclarée malade.

## II. — RÉSULTATS OBTENUS.

Le tableau I indique les résultats obtenus en moyenne pour les 4 catégories de traitements :

a) La première ligne indique les taux de malades : ces taux sont de 100 p. 100 dans les catégories O. L. et O. O. (*obscurité* avant l'inoculation), tandis qu'ils sont légèrement inférieurs à 100 p. 100 dans les catégories L. L. ou L. O. (*lumière* avant l'inoculation) ;

b) La deuxième ligne indique pour chaque catégorie la moyenne des temps d'incubation, avec la précision correspondante évaluée par le double de l'écart-type relatif à cette moyenne.

Si on compare deux à deux les résultats des 4 catégories, on constate que les différences sont toutes significatives (4), sauf

(3) Il est important de noter que la lecture était ainsi faite sur d'autres feuilles que la feuille soumise aux traitements « Lumière » ou « Obscurité », ce qui élimine toute influence possible de ces traitements sur le diagnostic.

(4) On notera que les différences entre temps moyens d'incubation sont accompagnées de différences sur les écarts-types correspondants,



une, celle qui a trait à la comparaison des catégories O. L. et O. O.

La mise à l'obscurité de la feuille *avant* son inoculation *diminue* de façon très significative le temps d'incubation, quelles que soient les conditions après l'inoculation (comparaison de L. L. et O. L., de L. O. et O. O.).

TABLEAU I.

	CATÉGORIE			
	L. L.	L. O.	O. L.	O. O.
Pourcentage de malades. . . .	96	88	100	100
Temps d'incubation (en jours). .	$17,5 \pm 3,1$	$30,2 \pm 7,5$	$11,8 \pm 0,6$	$11,3 \pm 0,6$
Temps au bout duquel 50 p. 100 des plantes de la catégorie étaient malades (en jours). .	13,5	32,5	11,1	10,8

La mise à l'obscurité de la feuille *après* son inoculation a un effet variable selon les conditions avant inoculation : succédant à un « pré-traitement » *lumière*, le « post-traitement » *obscurité* *augmente* significativement le temps d'incubation (comparaison de L. L. et L. O.).

Succédant au contraire à un « pré-traitement » *obscurité*, le « post-traitement » *obscurité* semble sans effet sur le temps d'incubation (comparaison de O. L. et O. O., différence non significative).

c) La troisième ligne indique pour chaque catégorie le temps nécessaire pour que 50 p. 100 des plantes d'une catégorie soient malades.

Précisons que ce p. 100 porte, non pas seulement sur les

ceux-ci étant d'autant plus grands que les temps d'incubation sont plus grands. Ces variations systématiques de l'écart-type, contraires aux hypothèses généralement admises dans l'analyse de la variance, semblent pouvoir s'expliquer ici, d'une part, par le fait que la répartition des temps d'incubation est proche de la loi logarithmico-normale, plutôt que de la loi normale, et par le fait, d'autre part, que le traitement « obscurité » est lui-même susceptible de fluctuations, qui se répercutent sur la variance totale : ceci est particulièrement vrai dans le cas du « post-traitement » *obscurité* dont la durée a varié selon les plantes, et explique pour partie l'écart-type élevé de la catégorie L. O. L'effet des traitements sur la variance n'infirme pas les conclusions énoncées d'après la comparaison des moyennes, il les confirme au contraire.

pieds qui deviennent malades, mais sur la population *totale* relative à chaque catégorie. Il offre ainsi la synthèse des résultats indiqués par les 2 premières lignes : en effet, dans les catégories où on n'a pas obtenu 100 p. 100 de malades, les pieds restés sains sont peut-être des malades à temps d'incubation très long, de sorte qu'en ne les prenant pas en considération dans le temps d'incubation moyen, on a obtenu un temps trop faible.

Cette erreur ne peut guère jouer que dans le cas de la catégorie L. O., la seule où le p. 100 de pieds malades diffère nettement de 100 p. 100. Comme les résultats des 2 premières lignes sont, à ce point de vue, concordants, en ce sens que le p. 100 de malades est plus faible dans les catégories où le temps d'incubation des malades est le plus grand, la troisième ligne ne peut qu'accentuer les écarts entre la catégorie L. O. et les autres.

### III. — DISCUSSION ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS.

Les résultats qui précèdent, indiquant une *diminution* du temps d'incubation par « *pré-traitement* » *obscurité*, et une *augmentation* du temps d'incubation par « *post-traitement* » *obscurité* lorsque celui-ci succède à un « *pré-traitement* » *lumière*, sont à rapprocher des résultats obtenus dernièrement par Bawden et Roberts [3].

Ces auteurs, travaillant avec divers virus et divers hôtes en combinaisons donnant des lésions nécrotiques, ont cherché l'influence du facteur lumière sur le nombre de lésions. La variation systématique du facteur lumière était envisagée, soit avant, soit après l'inoculation, c'est-à-dire dans des essais qui correspondraient aux catégories O. L. et L. O. de notre terminologie, en comparaison avec la catégorie témoin L. L. (la catégorie O. O. n'ayant pas été envisagée), et portait sur la *plante entière*.

Dans ces conditions, les auteurs ont observé que dans tous les cas le « *pré-traitement* » *obscurité* *augmentait* très nettement le nombre des lésions (comparaison O. L. et L. L.), tandis que le « *post-traitement* » *obscurité* (comparaison L. O. et L. L.) *diminuait* le plus souvent, quoique de façon moins nette, le nombre des lésions.

Nos conclusions sont donc analogues à celles de Bawden et Roberts, transposées du domaine des lésions nécrotiques au domaine de l'infection généralisante, en remplaçant grand nombre de lésions par temps d'incubation court, et petit nombre de lésions par temps d'incubation long. Si l'on extrapole au domaine des lésions nécrotiques les résultats donnés par notre

catégorie O. O., en comparaison avec L. O., on peut penser que la petitesse des effets obtenus par Bawden et Roberts dans le cas du « post-traitement » obscurité proviendrait du fait que dans la « pré-période » la lumière était peu intense (conditions de serre, influence de la saison, etc.).

L'analogie observée entre nombre des lésions dans le domaine des infections localisées et temps d'incubation dans le domaine des infections généralisantes mérite d'être discutée.

On peut en effet se demander si, entre les deux catégories de phénomènes constatés, il n'existerait pas une relation de nature causale :

a) Par analogie avec le phénomène constaté par Bawden et Roberts dans le cas des lésions locales, on peut supposer que le facteur lumière agit, dans notre domaine des infections généralisantes, sur le nombre des points d'entrée dans la feuille inoculée. Or, d'après Holmes [1], le temps d'incubation est d'autant plus court que le nombre des points d'entrée est plus grand.

Nous pensons toutefois que cette explication n'est pas valable ici car, au cours de nos propres recherches, nous avons fait varier systématiquement le nombre des points d'entrée du virus, en agissant notamment sur la concentration, et, contrairement à Holmes, nous n'avons jamais obtenu de variation systématique du temps d'incubation.

b) On peut supposer au contraire, par analogie avec les modifications de temps d'incubation que nous avons obtenues avec les infections généralisantes, que le facteur lumière agirait, dans le domaine des lésions locales, sur la vitesse de développement du virus en chaque point d'entrée, *relativement à la vitesse de réaction de l'hôte*. Cette relation causale nous paraît plausible, et nous nous proposons de l'adopter comme hypothèse de travail.

En tout état de cause, il nous semble établi que le facteur lumière n'agit pas seulement sur la probabilité de pénétration du virus en chaque point de la feuille (action qui pourrait n'être que mécanique en quelque sorte, par modification de la turgescence, par exemple), mais également sur la vitesse de développement du virus dans la feuille. Le seul examen de la catégorie L. O. suffit d'ailleurs à le prouver, puisque dans cette catégorie le traitement obscurité n'est intervenu qu'*après* pénétration du virus dans la feuille.

Il s'agit donc d'une modification du développement du virus apportée par les conditions de l'hôte, c'est-à-dire par le terrain infectieux.

Il faut remarquer, par ailleurs, que cette modification est vraisemblablement plus importante qu'on pourrait le croire d'après le seul examen des chiffres du tableau I.

En effet, le temps d'incubation peut être divisé en deux parties : une première période où le virus reste localisé dans la feuille d'inoculation (« phase foliaire »), et une deuxième période où le virus se répand dans le restant de la plante. Les traitements « lumière » et « obscurité » n'ayant porté que sur la feuille d'inoculation, on pourrait supposer que seule la durée de la phase foliaire a été modifiée par les traitements, la deuxième période ayant au contraire la même durée dans les 4 catégories.

Or, nous avons mesuré la durée de cette période sur des plantes témoins du type L. L. (5) : nous avons trouvé qu'elle est en général voisine des  $\frac{2}{3}$  du temps d'incubation total et en particulier dans l'expérience actuelle, sa valeur moyenne est d'environ onze jours.

On en déduirait par différence, à partir des temps d'incubation du tableau I, les durées suivantes pour les phases foliaires :

	CATEGORIE			
	L. L.	L. O.	O. L.	O. O.
Durée de la phase foliaire . . . .	6,5	19,2	0,8	0,3

On doit déduire de ces chiffres :

Ou bien, si l'hypothèse ci-dessus est exacte, que le développement du virus dans la feuille inoculée est susceptible de variations considérables en fonction du facteur lumière.

Ou bien que l'hypothèse ci-dessus est fausse, c'est-à-dire que la période d'expansion du virus *dans toute la plante* est elle-même de durée variable selon les catégories.

Dans l'un et l'autre cas, la conclusion est que le facteur lumière exerce une influence profonde sur le développement du virus dans les tissus de l'hôte.

#### IV. — RÉSUMÉ.

Lorsqu'on inocule au Tabac le virus de la Mosaïque du Tabac, le temps d'incubation de la maladie dépend des conditions de lumière auxquelles la feuille d'inoculation est soumise *avant et après* l'inoculation.

Un traitement « obscurité avant l'inoculation » diminue le temps d'incubation quelles que soient les conditions après inoculation.

Un traitement « obscurité après l'inoculation » a un effet

(5) Le principe de cette méthode, qui fera l'objet d'une publication ultérieure, consiste à amputer la feuille d'inoculation à des dates successives sur des séries de plantes, postérieurement à l'inoculation, et à étudier la variation du taux de malades en fonction du délai inoculation-amputation. On peut en déduire une valeur moyenne pour la durée de la phase foliaire.



variable selon les conditions précédant l'inoculation : si la feuille a été soumise à la lumière avant l'inoculation, le traitement augmente le temps d'incubation, mais si la feuille a été soumise à l'obscurité avant l'inoculation, le traitement semble sans effet.

Ces effets du facteur lumière ont été rapprochés des effets exercés par ce facteur sur le nombre des lésions dans les infections du type focalisant (Bawden et Roberts) ; cette comparaison nous a conduits à supposer que le facteur lumière agirait sur la vitesse de développement du virus dans les tissus de l'hôte.

L'importance de cette action apparaît encore plus clairement si l'on tient compte ici de la subdivision du temps d'incubation en deux phases, l'une de localisation dans la feuille inoculée, et la suivante d'expansion dans le reste de la plante. •

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] HOLMES (F. O.). *Boyce Thompson Contr.*, 1932, **4**, 297.
- [2] CALDWELL (J.). *Ann. Appl. Biol.*, 1931, **18**, 278 et 1934, **21**, 191.
- [3] BAWDEN (F. C.) et ROBERTS (F. M.). *Ann. Appl. Biol.*, 1947, **34**, 286 et 1948, **35**, 418.

**SUR LE CHOIX DES SOUCHES ETALONS  
POUR LA DÉTECTION DU BACILLE TYPHIQUE  
DANS LES EAUX  
PAR LA RECHERCHE DES BACTÉRIOPHAGES  
SPÉCIFIQUES**

par A. GUELIN.

*(Institut Pasteur, Service du Bactériophage  
et Laboratoire d'Hydrobiologie du C.N.R.S. de Gif-sur-Yvette.)*

Si la définition des eaux polluées est possible par l'application des méthodes bactériologiques courantes, il n'en est pas de même pour la détection, dans ces eaux, du bacille typhique. Tous les moyens appliqués jusqu'ici ont pratiquement échoué. Seule, la recherche et le titrage des bactériophages spécifiques permettent actuellement d'entrevoir une solution à cet important problème de l'hygiène des eaux.

La méthode a pour base la conception, devenue classique, suivant laquelle la plupart des bactéries sont accompagnées par des bactériophages actifs. C'est pourquoi l'isolement à partir d'un échantillon d'eau d'un bactériophage typhique Vi, actif exclusivement sur les souches Vi du bacille d'Eberth, permet de supposer la présence de celles-ci dans cette eau.

Dans certains cas, la présence d'un tel bactériophage peut s'expliquer par sa filtration à travers le sol sans que les bactéries l'aient suivi. Ou bien encore, comme nous l'avons déjà constaté, les bactéries disparaissant plus vite, le bactériophage isolé ne serait que le témoin attardé du passage des bacilles déjà disparus.

Même dans ces cas, l'importance de l'isolement du bactériophage Vi reste indiscutable. L'étude géologique du terrain permettra d'apprécier à sa juste valeur la possibilité de filtration du bactériophage à travers le sol. Et, dans les cas positifs, sa présence indiquera l'existence d'un foyer infectieux proche susceptible, dans certaines conditions, de devenir une source directe de contamination des eaux.

Dans le cas où le bactériophage Vi isolé des eaux est le

témoin des bactéries disparues, sa présence prend encore plus d'importance, car elle signale le danger de contamination directe des réservoirs d'eau. Même si elle n'a été que passagère, on peut toujours craindre que cette contamination ne réapparaisse un jour et ne devienne permanente. Comme le remarque justement le Dr Buttiaux, dans le domaine de l'hygiène des eaux, il vaut mieux prévenir que constater.

Néanmoins, la possibilité de déceler l'éventualité d'une contamination garde toujours son intérêt. Elle est réalisable, du fait que, si le bactériophage Vi introduit dans les eaux ne varie pas qualitativement, il n'en est pas de même quantitativement. Pendant une année, nous avons observé le bactériophage typhique Vi dans un bassin d'eau non stérile exposé en plein air. Son comportement vis-à-vis de diverses souches du groupe *coli*-typhique-dysentérique est resté invariable, même après onze mois ; mais sa quantité a, dès les premiers mois, diminué progressivement, surtout à la surface du bassin.

L'étude quantitative dans une eau du bactériophage Vi soumis à l'action de différents facteurs (aération, température, lumière, facteurs biologiques, etc.) permettra d'établir la courbe de disparition de ce phage en fonction du temps. En précisant ainsi la valeur de certaines quantités de bactériophages Vi trouvées dans les eaux, on pourra se faire une idée sur l'ancienneté de la contamination de ces eaux.

SUR L'IMPORTANCE DES SOUCHES ÉTALONS. — A côté des méthodes purement bactériologiques, la méthode bactériophagique s'impose par sa rapidité et sa sensibilité ; très souvent, des dilutions au 10/000 suffisent pour avoir des résultats au bout de dix à douze heures.

L'interprétation des résultats sera d'autant plus exacte que les souches étalons adoptées pour la détection des phages Vi dans les eaux seront mieux choisies. Il est indispensable d'avoir des souches typhiques exclusivement sensibles aux bactériophages Vi, pour éviter l'isolement de phages polyvalents, ces derniers se multipliant souvent aux dépens de bactéries autres que le bacille typhique. Les bactériophages isolés dans les eaux au moyen de souches Vi étroitement spécifiques permettront d'envisager que ces eaux ont été, à un moment quelconque, en contact avec un foyer de contamination.

Il reste à savoir sur quelles souches il faut arrêter son choix. Nous avons déjà constaté que, parmi les 10 souches du bacille typhique Vi conservées au laboratoire, 9 étaient sensibles non seulement aux phages du groupe *Salmonella*, mais souvent aussi à d'autres phages du groupe intestinal (*coli*, dysentérique). L'emploi de telles souches compliquerait considérablement la

recherche des phages Vi car elles décélèraient en même temps une série de phages non Vi.

Pour éviter ces inconvénients, les souches, avant d'être employées, doivent être soigneusement étudiées *au point de vue de leur sensibilité vis-à-vis des phages les plus divers*. Après quoi, on gardera seulement celles qui sont attaquées par les phages typhiques Vi.

L'étude de la sensibilité des souches typhiques vis-à-vis de différents bactériophages s'effectue en deux étapes : évaluation de la sensibilité des souches 1° avec des bactériophages standards de laboratoire et 2° avec des bactériophages sauvages.

1° EVALUATION DE LA SENSIBILITÉ DES SOUCHES AVEC LES PHAGES DU LABORATOIRE. — Les souches typhiques, après vérification de la présence de l'antigène Vi à l'aide de l'anti-sérum correspondant, sont ensemencées sur des boîtes de gélose à 1,5 p. 100. Chaque souche étalée est mise en contact avec des filtrats bactériophagiques du groupe intestinal, déposés isolément sur la plaque à l'aide d'une pipette effilée ou de l'anse de platine. La réaction de ces souches vis-à-vis des filtrats bactériophagiques permettra de choisir celles qui sont sensibles exclusivement aux phages typhiques Vi.

Cette sélection préalable par les phages du laboratoire est nécessaire pour limiter la quantité de souches avant d'éprouver celles-ci par des bactériophages sauvages. Cette dernière opération, d'une importance primordiale, exige plus de manipulations et doit être faite de préférence avec des souches peu nombreuses.

2° EVALUATION DE LA SENSIBILITÉ DES SOUCHES VIS-A-VIS DES BACTÉRIOPHAGES SAUVAGES. — Il est possible qu'une souche Vi, sélectionnée par le moyen indiqué, possède encore d'autres antigènes qui n'ont pas été mis en évidence à cause de la quantité insuffisante des bactériophages de laboratoire. Cette souche, mise en contact avec une source naturelle de bactériophages divers (comme l'eau d'égout, par exemple), permettra de déceler une certaine quantité de phages autres que les phages Vi. *L'étude du spectre d'action de ces nouveaux bactériophages renseignera dans une certaine mesure, sur la composition antigénique de la souche au moyen de laquelle ils ont été isolés*. Il ne restera qu'à éliminer les souches révélatrices des phages non typhiques.

Ce dernier procédé permet d'évaluer le comportement d'une souche hors du laboratoire et en présence de nombreux facteurs souvent inconnus. Si, éprouvée de cette façon, elle donne des résultats positifs, elle peut être considérée comme une souche Vi étalon ; mais on doit néanmoins la garder en observation permanente.



EXEMPLE DU CHOIX DES SOUCHES ÉTALONS. — Le principe du choix des souches étalons peut aussi être appliqué à la détection dans les eaux d'autres agents pathogènes (B. dysentériques ou vibrion cholérique, par exemple). Bien entendu, les recherches avec le bacille typhique sont rendues plus précises du fait de l'existence de l'antigène Vi (Felix) et des bactériophages très spécifiques, actifs sur les germes porteurs de cet antigène (Sertie et Boulgakov, Scholtens, Craigie et Brandon).

L'étude de nos deux souches étalons, bacille typhique Vi et bacille paratyphique B de Wollman, faite avec M<sup>lle</sup> Le Bris, peut servir d'exemple :

1° Après épreuve de nombreuses souches typhiques et paratyphiques B avec les bactériophages du laboratoire, notre choix s'est arrêté sur 6 souches exclusivement sensibles soit aux bactériophages typhiques soit aux phages paratyphiques B et non sensibles à ceux du groupe *coli*-dysentérique. Les souches ainsi choisies sont : le bacille typhique Vi de Wollman et 5 souches paratyphiques B (1, 2, 3, 4 et Wollman).

2° 20 cm<sup>3</sup> d'eau d'égout mélangés au bouillon sont ensemencés avec chacune de ces souches. Les 6 filtrats obtenus après quelques heures à 37° forment de grandes et de petites plages.

3° A partir de plages uniques (grandes et petites et après 6 passages successifs), on prépare 11 bactériophages isolés de l'égout par l'intermédiaire des 6 souches éprouvées. Les bactériophages sont : le phage typhique Vi Le Bris et 10 bactériophages paratyphiques B « grandes » et « petites » plages des souches (1, 2, 3, 4 et Wollman).

4° L'étude du spectre d'action de ces nouveaux bactériophages montre la spécificité étroite de deux souches : le bacille typhique Vi et le bacille paratyphique B de Wollman \*. En effet, les phages isolés de l'égout avec ces deux souches sont actifs, soit sur le bacille typhique Vi seul, soit sur le bacille paratyphique B seul.

Par contre, certains bactériophages obtenus avec d'autres bacilles paratyphiques B sont en même temps actifs sur le bacille

(\*) Nous remercions M<sup>me</sup> Grabar d'avoir eu l'obligeance d'examiner les deux souches. a) *bacille typhique Vi Wollman* : Souche en forme S. L'agglutination dans l'eau (10,8 p. 100 et 2 p. 100) est négative. Analyse antigénique : E-polyvalent : + ± ; IX : négat., Vi : XX ; d : ±. b) *Bacille paratyphique B Wollman* : Souche en forme S. L'agglutination dans l'eau (10,8 p. 100 et 2 p. 100) est négative. La souche se dissocie en donnant deux sortes de colonies : une opaque et une transparente. Analyse antigénique de deux sortes de colonies : B-polyvalent : ++ ; XII : ± ; IV : + ; V : + ; b : ++ ; 1,2 —. Les réactions biochimiques de deux colonies sont identiques et typiques pour une souche de bacille paratyphique B.

TABLEAU I. — Sensibilité de diverses bactéries aux bactériophages d'égout, isolés à l'aide de six souches typhiques.

SOUCHES	BACTÉRIOPHAGES										
	Ty Vi (Le Bris)	Para B (Wollman)		Para B-1		Para B-2		Para B-3		Para B-4	
		gp.	pp.	gp.	pp.	gp.	pp.	gp.	pp.	gp.	pp.
B. typhique Vi :											
1 . . . . .	—	—	—	lc.	—	lc.	—	lc.	—	lc.	lc.
D . . . . .	—	—	—	lc.	—	lc.	—	lc.	—	lc.	lc.
Kiss . . . . .	—	—	—	lc.	—	lc.	—	lc.	—	lc.	lc.
Boeglin . . . . .	lc.	—	—	lc.	—	lc.	—	lc.	—	lc.	lc.
x . . . . .	lc.	—	—	lc.	—	lc.	—	lc.	—	lc.	lc.
y . . . . .	lc.	—	—	lc.	—	lc.	—	lc.	—	lc.	lc.
z . . . . .	lc.	—	—	lc.	—	lc.	—	lc.	—	lc.	lc.
2 . . . . .	lc.	—	—	lc.	—	lc.	—	lc.	—	lc.	lc.
Wollman . . . . .	lc.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
7 . . . . .	lc.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Shanange . . . . .	lc.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
B. typhique O . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
B. typhique H . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
B. paratyphique A . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
B. paratyphique B :											
B-1 . . . . .	—	lc.	lc.	lc.	lc.	lc.	lc.	lc.	lc.	lc.	lc.
B-2 . . . . .	—	lc.	lc.	lc.	lc.	lc.	lc.	lc.	lc.	lc.	lc.
B-3 . . . . .	—	lc.	lc.	lc.	lc.	lc.	lc.	lc.	lc.	lc.	lc.
B-4 . . . . .	—	lc.	lc.	lc.	lc.	lc.	lc.	lc.	lc.	lc.	lc.
Wollman . . . . .	—	lc.	lc.	lc.	lc.	lc.	lc.	lc.	lc.	lc.	lc.
Forme R . . . . .	—	lc.	—	lc.	—	lc.	—	lc.	—	lc.	—
B. coli . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
B. paratyphérique . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
B. de Shiga . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

gp., grandes phages; pp., petites plages; lc, lyse complète; —, résultats négatifs.

typhique Vi. C'est le cas de 4 filtrats « petites plages » qui, tous sans exception, sont polyvalents. Mais les 4 filtrats « grandes plages » provenant des mêmes souches n'attaquent que les bacilles paratyphiques B (tableau I).

Dans le tableau II sont exposés quelques résultats des premières recherches qualitatives faites, dans les baies de Nice et de Villefranche, avec les deux souches étalons (typhique et paratyphique). Ces recherches, effectuées dans des eaux naturelles, différemment polluées, sont assez démonstratives, mais demandent à être complétées par des recherches quantitatives.

Nous sommes heureuse de profiter de cette occasion pour exprimer toute notre reconnaissance à M. le professeur Trégouboff, directeur de la Station Zoologique de l'Université de Paris, à Villefranche-sur-Mer, où ces recherches ont été faites.

TABLEAU II. — Recherches qualitatives du bactériophage dans la Baie des Angès (Nice) et la Baie de Villefranche.

LIEU DES PRÉLÈVEMENTS	BACTÉRIOPHAGES isolés avec les souches étalons			QUANTITÉ de bactéries par litre
	Ty Vi	Para B	Coli	
Baie de Villefranche :				
Port . . . . .	—	—	lc.	} N'a pas été examinée.
Egout { de la citadelle . . . . .	—	—	lc.	
	?	Trace.	lc.	
	central . . . . .	lc.	lc.	
Plage . . . . .	—	—	lc.	
Vase putride . . . . .	—	—	lc.	
Au milieu de la baie . . . . .	—	—	—	
A la sortie de la baie (côté Nice) . . . . .	—	—	lc.	
Baie des Angès (Nice) :				
Face au monument aux morts . . . . .	—	—	—	—
Plage . . . . .	—	—	lc.	20
Ecoulement des eaux ménagères . . . . .	?	Trace.	lc.	460
Entre la côte et le Grand collecteur (1) . . . . .	lc.	lc.	lc.	2.200
Grand collecteur { 2 m. au large . . . . .	lc.	lc.	lc.	7.600
	250 m. au large . . . . .	lc.	lc.	460
	500 m. au large . . . . .	lc.	lc.	4.000
	1.500 m. au large . . . . .	?	Trace.	lc.
2.000 m. au large . . . . .	—	—	lc.	—
3 à 4 km. de la côte . . . . .	—	—	—	—

lc., lyse complète; —, résultats négatifs.  
(1) Le débouché du Grand collecteur se trouve à environ 60 m. au large.

lc., lyse complète; —, résultats négatifs.

(1) Le débouché du Grand collecteur se trouve à environ 60 m. au large.

## RÉSUMÉ.

La détection indirecte du bacille typhique dans les eaux peut être effectuée par la recherche des bactériophages spécifiques.

Cette méthode est fondée sur la conception classique selon laquelle la plupart des bactéries sont accompagnées de bactériophages actifs sur des échantillons des mêmes espèces.

Par conséquent, la constatation, dans les eaux polluées, de bactériophages strictement spécifiques des souches Vi du bacille typhique, permettra de conclure que ces eaux ont été, à un moment donné, contaminées par le bacille d'Eberth.

Les recherches de tels bactériophages exigent des souches étalons qui sont choisies d'après le procédé indiqué dans ce travail.

## INFORMATION

La Société française de Microscopie et l'Institut d'Optique organisent du 20 au 25 novembre 1950 une série de conférences et de démonstrations comprenant quatre conférences sur les *Techniques modernes en microscopie*.

M. Locquin : Généralités.

M. Françon : Perception des images.

M. Nomarski : Appareillage moderne.

M. Manigault : Emploi du microscope comme instrument d'observation et de mesures dans les recherches chimiques, physiques et biologiques.

Ces conférences seront publiques. Les auditeurs porteurs d'une carte d'entrée seront admis par priorité. S'adresser pour retirer cette carte à M. Locquin, secrétaire de la Société française de Microscopie, 12, rue de Buffon, Paris (5<sup>e</sup>). Le lieu de ces conférences sera précisé ultérieurement.

Les démonstrations feront l'objet d'un droit global d'inscription de 2.000 fr.

Une documentation écrite sera remise à chaque séance. On envisage un cycle de 12 séances environ, à raison de 3 séances de deux heures par jour, du 21 au 25 novembre (6 participants au maximum par démonstration assistés par un démonstrateur).

### *Liste des démonstrations.*

	DÉMONSTRATIONS
Principes généraux . . . . .	1
Contrastes de phase classiques . . . . .	2
Contrastes de phase variables. . . . .	3
Microscopie en ultra-violet. . . . .	1
Microscopie en infra-rouge . . . . .	1
Microscopie par fluorescence . . . . .	1
Aberrations en microscopie. . . . .	1
Mesures au microscope. . . . .	2

La liste ci-dessus est donnée à titre indicatif. Des démonstrations de photomicrographie sont envisagées pour une session ultérieure.



# SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(*Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15<sup>e</sup>.*)

Séance du 1<sup>er</sup> Juin 1950.

Présidence de M. MAGROU.

## COMMUNICATIONS

### TROIS CAS D'INFECTION DE LABORATOIRE PAR LE VIRUS DE LA MALADIE DE NEWCASTLE

par P. LÉPINE, P. ATANASIU et M<sup>lle</sup> G. GAREAU.

La maladie de Newcastle est aujourd'hui bien individualisée ; elle est répandue en de nombreux pays (Kraneweld [1], Doyle [2], Beach [3], Stover [4], Ysaksson et Norberg [5], Lépine, Jacotot, Atanasiu et Vallée [6], Bakos et Norberg [7]) où elle détermine soit des foyers isolés, soit des épizooties ayant le tableau clinique de la peste aviaire.

Le virus de cette maladie des volailles s'est montré susceptible d'infecter l'homme et plusieurs observations ont été rapportées récemment (Burnet [8], Anderson [9], Shimkin [10], Yatom [11], Beatrice Howitt, Lindsay Bishop, Robert Kissling [12], Jacotot, Vallée, Le Priol [13], Ingalls et Mahony [14]).

Les symptômes observés chez l'homme consistent le plus souvent en une conjonctivite résultant soit d'une infection spontanée (agriculteurs, personnel plumant les volailles), soit d'une infection de laboratoire ; et d'autres fois, l'infection revêt l'aspect de pneumopathies atypiques. Ce n'est que très rarement que l'on observe des symptômes neurologiques résultant du neurotropisme du virus, lequel est très marqué chez les volailles avec certaines souches.

Nous avons observé dans notre laboratoire 3 cas humains de conjonctivite, conséquence de contaminations accidentelles au cours des manipulations d'une souche du virus de la maladie de Newcastle précédemment isolée en France [6].

Les deux premiers cas résultent d'une contamination simultanée de deux opérateurs qui étaient occupés à injecter par voie intraveineuse un lapin avec un liquide allantoïque virulent en vue de la préparation d'un sérum neutralisant. Un mouvement subit de l'animal ayant séparé la seringue de la canule, un jet de liquide atteignit les deux opérateurs à la face. Tous deux furent immédiatement traités par l'instillation

conjonctivale de plusieurs gouttes d'une solution d'argyrol à 2 p. 100. Cette mesure prophylactique s'est montrée complètement inopérante et les deux sujets présentèrent une conjonctivite bilatérale.

Le troisième cas concerne un travailleur manipulant les liquides allantoïques infectés, qui fut probablement atteint par le rejaillissement d'une goutte échappée à une pipette. Il présenta une conjonctivite qui resta monoculaire.

Du point de vue clinique, les 3 cas ont évolué d'une manière identique : après l'inoculation du matériel infectant, la maladie s'est déclenchée au bout de vingt à trente heures, brusquement, se manifestant par des douleurs oculaires violentes atteignant tout le globe oculaire. Au bout de quelques heures survient une sensation de corps étranger conjonctivale, sans que le malade puisse lui donner une localisation précise, sensation accompagnée d'une impression de fatigue et de lourdeur de l'œil.

L'examen objectif effectué à cette période demeure négatif.

Rapidement, la photophobie apparaît, les douleurs s'accroissent, la conjonctive globulaire présente une hyperhémie manifeste et il y a du larmolement. Les symptômes atteignent leur maximum au bout de quarante-huit heures, s'accompagnent d'une photophobie aiguë et se traduisent par une hyperhémie généralisée de la conjonctive avec, au réveil, une sécrétion abondante. La sensation de corps étranger persiste et s'accompagne de douleurs irradiées dans le front, la région temporale et le fond de l'œil. Le troisième jour, les douleurs diminuent mais les réactions locales restent aussi violentes. Le cinquième jour, les phénomènes locaux s'atténuent puis disparaissent, laissant seulement persister une légère douleur avec sensation de lourdeur mal définie ; cette dernière, ainsi que la fatigue oculaire, subsistent en s'atténuant progressivement jusqu'au trentième ou quarantième jour où la guérison tant objective que subjective est complète.

Les deux premiers sujets atteints ont été traités dès le second jour par l'auréomycine en instillations locales (collyre en flacon d'origine). Le troisième sujet, ayant jugé l'auréomycine irritante, refusa cette thérapeutique et se contenta d'une médication locale et symptomatique classique. Son infection ne se montra néanmoins ni plus aiguë, ni d'une évolution plus longue que celle des sujets traités. À juger superficiellement, il semblerait donc que le traitement par l'auréomycine n'a pas réussi à influencer le cours de la maladie plus que l'instillation d'argyrol n'avait réussi à l'empêcher.

Cette conclusion ne nous paraît pas justifiée. D'une part, en effet, la contamination des deux premiers sujets traités par l'auréomycine a été massive et bilatérale ; d'autre part, chez le troisième sujet, non traité, la contamination a été plus légère, elle est restée unilatérale. Mais si la durée de l'évolution, de même que l'intensité des phénomènes ont été sensiblement les mêmes dans les 3 cas, l'étude expérimentale de ces trois contaminations fait apparaître des différences tranchées.

**ISOLEMENT DU VIRUS ET ÉTUDE IMMUNOLOGIQUE.** — Chez les deux premiers malades, les tentatives d'isolement du virus à partir de l'exsudat conjonctival sont restées vaines et les ensemencements des œufs sont demeurés stériles.

Nous pensons que c'est la présence de l'auréomycine qui est responsable de ces effets. En outre, le sérum des deux sujets, examiné de façon répétée par la suite, n'a pas montré d'inhibition sérologique dans la réaction d'héماغglutination : les deux malades traités par l'auréomycine ne présentent donc pas d'anticorps.

Au contraire, chez le troisième sujet, il a été possible d'isoler directement le virus de l'exsudat conjonctival les deuxième et troisième jours. Le matériel est récolté par instillation oculaire avec de l'eau physiologique. De la pénicilline et de la streptomycine ont été employées pour la purification du virus. Le liquide de lavage du deuxième jour (0,25 0,50 cm<sup>3</sup>) inoculé dans le liquide chorio-allantoïdien d'œufs de onze jours leur a donné la maladie entre quatre et six jours (100 p. 100). Cinq passages consécutifs ont été effectués sur les œufs ; ils ont donné une réaction d'héماغglutination positive et des lésions anatomo-pathologiques typiques. Le liquide du troisième jour était déjà moins virulent, mais a tout de même permis d'isoler à nouveau le virus.

Le sujet a présenté par la suite une réaction classique et positive d'héماغ-inhibition.

En dehors de la réaction d'héماغ-inhibition, nous avons employé également la technique de neutralisation du virus isolé par les trois sérums. Nous avons utilisé la technique suivante :

La souche isolée ayant provoqué 50 p. 100 de mortalité à la dilution 10—<sup>7</sup>, cette dilution est achevée avec le sérum (à parties égales) et laissée en contact une heure à 37°. On inocule 0,10 cm<sup>3</sup> de ce mélange dans le liquide chorio-allantoïdien d'œufs de onze jours. Pour chaque

	1 <sup>er</sup> JOUR	2 <sup>e</sup> JOUR	3 <sup>e</sup> JOUR	6 <sup>e</sup> JOUR	OBSERVATION
Sérum I . . . . a (2)	0/10 (1)	10/10		10/10	Négatif
Sérum I . . . . b (3)	0/10	8/10	10/10	10/10	Négatif
Sérum I . . . . c (4)	0/10	7/10	10/10	10/10	Négatif
Sérum II. . . . . a	0/10	10/10	10/10	10/10	Négatif
Sérum II. . . . . b	0/10	7/10	10/10	10/10	Négatif
Sérum III . . . . . a	0/10	10/10		10/10	Négatif
Sérum III . . . . . b	0/10	0/10	0/10	0/10	Positif
Sérum III . . . . . c	0/10	0/10	0/10	0/10	Positif
Sérum immun . . .	0/10	0/10	0/10	0/10	Positif
Eau physiologique .	0/10	10/10	10/10	10/10	Négatif

(1) Nombre de morts/nombre d'œufs inoculés.

(2) Sérum récolté après 48 heures.

(3) Sérum récolté après 10 jours.

(4) Sérum récolté après 40 jours.

sérum, on emploie 10 œufs. Les résultats se trouvent résumés dans le tableau ci-joint.

Les sérums du premier et deuxième cas sont négatifs ; le troisième, récolté quarante-huit heures après le début de la maladie, ne contient pas d'anticorps spécifiques, mais les sérums de dix jours et quarante jours neutralisent complètement le virus.

Un sérum humain normal et le sérum physiologique restent négatifs. Un sérum de lapin immunisé avec le virus de Newcastle (souche « Var ») est positif.

Des essais expérimentaux, effectués sur les animaux (singes et souris), sans gratter la conjonctive, avec du liquide chorio-allantoïdien massivement infecté, sont restés négatifs.

CONCLUSION. — Trois cas humains d'infection de laboratoire par le virus de Newcastle se sont comportés de façon identique quant à la symptomatologie (conjonctivite) et à l'évolution, bien que deux des cas aient été traités par des instillations d'argyrol à titre prophylactique et d'auréomycine à titre thérapeutique.

° Néanmoins le virus n'a pu être récupéré que chez le troisième sujet, non traité, qui a seul présenté par la suite une réaction d'hémo-inhibition positive et des anticorps neutralisants dans son sérum sanguin.

Il semble donc que l'auréomycine en instillations conjonctivales réduise la maladie humaine à ses manifestations locales et empêche à la fois l'infection générale, apparente ou non, et les manifestations d'immunité qui l'accompagnent.

(Institut Pasteur. Service des Virus.)

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] KRANEWELD (F. C.). *Ned.-Ind. Bl. Diergeneesk.*, 1926, **38**, 448.
- [2] DOYLE (T. M.). *J. comp. Path. Therap.*, 1927, **40**, 144-169.
- [3] BEACH (J. R.). *Nulaid News*, 1940, **48**, 13.
- [4] STOVER (D. E.). *Amer. J. veter. Res.*, 1942, **3**, 239.
- [5] YSAKSSON (A. K.) et NORBERG (B. K.). *Stand. vet. Tidskr.*, 1948, 154.
- [6] LÉPINE (P.), JACOTOT (H.), ATANASIU (P.) et VALLÉE (A.). *Ces Annales*, 1949, **77**, 84.
- [7] BAKOS (K.) et NORBERG (B. K.). *Nord. veter. Med.*, 1949, **739**, 749.
- [8] BURNET (F. M.). *Med. J. Australia*, 16 oct. 1943, 313.
- [9] ANDERSON (S. G.). *Med. J. Australia*, 1946, 371.
- [10] SHIMKIN (N. I.). *Brit. J. Ophth.*, 1946, **30**, 260.
- [11] YATOM. *J. Amer. med. Assoc.*, 1946, **132**, 169.
- [12] HOWITT (Beatrice F.), BISHOP (Lindsay K.) et KISSLING (Robert E.). *Amer. J. publ. Health*, 1948, **38**, 1263.
- [13] JACOTOT (H.), VALLÉE (A.) et LE PRIOL (A.). *Bull. Acad. Méd.*, 1950, **134**, 106.
- [14] INGALLS (W. L.) et MAHONY (A.). *Amer. J. publ. Health*, 1949, **39**, 737-740.



## REMARQUES SUR L'AGGLUTINATION DES GLOBULES ROUGES DE MOUTON PAR LE VIRUS DE LA POLIOMYÉLITE, SOUCHE MM

par MIREILLE GASTAMBIDE-ODIER. (\*)

Plusieurs auteurs ont observé l'agglutination des globules rouges de mouton par les virus poliomyélitiques Lansing, SK et MM (1, 2, 3, 4, 5). Ils empruntent leur méthode de titrage du pouvoir agglutinant à Hirst (6). Cependant les détails de l'exécution des dosages varient d'un chercheur à l'autre. C'est ainsi que Bremer et Mutsaers (2) emploient des globules rouges en suspension dans l'eau physiologique à la concentration de 2.500.000 globules par millimètre cube et lisent leurs résultats au bout d'une heure. Verlinde et de Baan utilisent des suspensions de globules à 0,25 p. 100 et lisent leurs résultats au bout de deux à quatre heures et une nuit. Quant à Olitsky et Yager, ils utilisent des suspensions de globules à 0,5 p. 100 et lisent leurs résultats au bout d'une à deux heures.

Ni les uns, ni les autres, ne précisent à quels intervalles le mouton fournissant du sang est saigné.

Les expériences que nous rapportons ici concernent la souche MM. En voulant confirmer les observations citées, nous avons pu constater que les résultats obtenus dépendent avant tout de la qualité et de la dilution des globules rouges utilisés, ainsi que du temps de lecture des résultats. Nous décrivons donc ci-dessous les variations du pouvoir agglutinant en fonction de ces données.

### I. — MATÉRIEL.

a) *Globules rouges de mouton.* — Nous avons utilisé 4 types de préparations d'hématies :

A. — Le sang est prélevé quatre jours avant l'expérience sur un mouton saigné habituellement tous les quinze jours. Le jour même de la saignée, il est immédiatement défibriné par agitation avec des billes de verre, centrifugé, décanté et lavé jusqu'à ce que le liquide

(\*) Ce travail a été exécuté grâce à une bourse octroyée par l'Union internationale des Sciences biologiques.

(1) C. HALLAUER, *Proceed. 4th Internat. Congress Microbiol.*, 1947, 257, Copenhague, 1949.

(2) A. BREMER et W. MUTSAERS, *C. R. Soc. Biol.*, 1948, **142**, 1194.

(3) A. BREMER, *C. R. Soc. Biol.*, 1949, **143**, 883.

(4) J. D. VERLINDE et P. DE BAAN, ces *Annales*, 1949, **77**, 632.

(5) P. K. OLITSKY et R. H. YAGER, *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, Utica 1949, **71**, 719.

(6) G. K. HIRST, *J. exp. Med.*, 1942, **75**, 49.

urnageant soit incolore (trois à quatre fois). On le conserve à la glacière jusqu'au moment de l'emploi.

B. — Le sang est prélevé trois jours avant l'expérience sur un mouton saigné habituellement à intervalles très espacés. Il subit le même traitement que le sang A.

C. — Le sang est prélevé trois jours avant l'expérience sur un mouton saigné habituellement à intervalles très espacés. Le jour même de la saignée, il est immédiatement recueilli dans quelques centimètres cubes de citrate de soude à 5 p. 100, centrifugé, décanté et lavé jusqu'à ce que le liquide surnageant soit incolore. On le conserve à la glacière à 4° jusqu'au moment de l'emploi.

D. — Le sang est prélevé vingt-cinq jours avant l'expérience sur un mouton saigné habituellement une fois par mois. Le jour même de la saignée, il est immédiatement mélangé à volume égal avec du liquide d'Alsever (7) et conservé à la glacière à 4°. Le jour de

### Résultats.

QUALITÉ des globules rouges de mouton	CONCENTRATION des globules rouges p. 100	TEMPS de lecture	TITRE
<i>Saignée tous les 15 jours :</i>			
A. Globules défibrinés par agitation avec des billes de verre.	0,52	1 h. 1/2	—
		1 nuit.	—
	2	1 h. 1/2	—
		1 nuit.	—
<i>Saignée à intervalles très espacés :</i>			
B. Globules (dosage n° 1) défibrinés par agitation avec des billes de verre.	0,25	1 h. 1/2	1/160 ++
			1/320 ++
	2	1 nuit.	1/640 +
			1/80 ++
B. (dosage n° 2 : exécuté avec un matériel neuf à une autre date que le dosage n° 1).	0,25	1/160 +	1/160 ++
		1 h. 1/2	1/80 ++
	0,25	3 heures.	1/80 ++
		1 nuit.	1/40 ++
C. Globules citratés.	0,25	3 heures.	1/80 ++
			1/160 +
	1 nuit.	1/40 ++	1/40 ++
		<i>Saignée 1 fois par mois :</i>	
D. Globules conservés dans le liquide d'Alsever.	0,25	1 h. 1/2	1/160 ++
			1/160 ++
	0,5	1 h. 1/2	1/80 ++
		1	

—, pas d'agglutination ; +, agglutination faible ; ++, agglutination forte.

(7) J. B. ALSEVER et R. B. AINSIE, *New York State J. Med.*, 1941, 41, 126.

l'expérience on le centrifuge, on le décante et on le lave à l'eau physiologique jusqu'à ce que le liquide surnagant soit incolore.

b) *Cerveaux de souris atteintes de poliomyélite, souche MM.* — Les cerveaux utilisés proviennent de 2 souris blanches inoculées avec une émulsion de cerveau MM (au 1/10) deux jours avant l'expérience et mortes ou paralysées le jour même de l'expérience.

Les cerveaux sont prélevés stérilement, broyés au mortier, dilués au 1/10 dans de l'eau physiologique et centrifugés pendant trente minutes à 3.600 tours/min. (ou 6.000 tours/min.). Le liquide surnageant est considéré comme suspension de virus à 1/10.

c) *Cerveaux de souris neuves.* — Les cerveaux de 2 souris blanches neuves sont prélevés stérilement et traités exactement comme les cerveaux des 2 souris atteintes de poliomyélite souche MM.

## II. — MÉTHODE DE TITRAGE.

Cette méthode empruntée à Hirst (6) consiste à mesurer le pouvoir agglutinant du virus sur une suspension d'hématies de mouton (0,25 p. 100 ; 0,5 p. 100 ; 1 p. 100 ; 2 p. 100) préparée à partir des culots de globules rouges de mouton lavés antérieurement.

La réaction se fait dans des tubes à hémolyse d'un diamètre intérieur de 10 à 12 mm., longs de 80 mm. avec fond arrondi.

On dilue la suspension de virus MM comme suit :

1/20, 1/40, 1/80, ....., etc. (0,5 cm<sup>3</sup> par tube).

Parallèlement, la suspension témoin (cerveaux neufs) est diluée de la même manière. Un tube servant de témoin des globules rouges contient 0,5 cm<sup>3</sup> d'eau physiologique.

On ajoute à tous les tubes 0,5 cm<sup>3</sup> d'une suspension d'hématies.

Les tubes sont agités soigneusement et placés de préférence à basse température (+ 4°). La réaction est lue après une heure et demie à trois heures, ainsi qu'après une nuit.

L'agglutination est positive lorsque les hématies se présentent sous forme d'un dépôt irrégulier occupant la demi-sphère du fond du tube. L'agglutination est négative si les hématies sont sédimentées sous forme d'un petit disque rond et régulier.

Le titre cherché est la dernière dilution à laquelle on observe encore l'agglutination.

## CONCLUSIONS.

Les globules rouges provenant d'un mouton saigné tous les quinze jours ne peuvent être utilisés pour la réaction d'agglutination par le virus MM. Ces mêmes globules sont, par contre, utilisables dans les réactions de déviation du complément (virus de la maladie de Nicolas et Favre). En effet, des réactions de déviation du complément ont pu être effectuées par un autre chercheur du laboratoire, à la même

(8) WHITMAN, J. *Immunol.*, 1947, **56**, 167.

date et avec les mêmes globules que ceux que nous avons utilisés pour le virus MM.

Le sang de mouton, soit défibriné par agitation avec des billes de verre, soit citraté, soit conservé par le liquide d'Alsever, convient parfaitement à la réaction d'agglutination par le virus MM, pourvu qu'il provienne d'un mouton qui ne soit pas saigné trop fréquemment.

Les dilutions de globules rouges, qui donnent les taux les plus élevés, se situent entre 0,25 p. 100 et 0,5 p. 100. Les résultats de Bremer et Mutsaers (2), obtenus avec des globules dont la concentration est de 2.500.000 par millimètre cube, nous paraissent surprenants, car déjà, avec une concentration de globules à 1 p. 100, le titre d'agglutination est plus faible. D'autre part, Whitman (8), dans un travail concernant le virus grippal, a démontré que pour des concentrations de globules rouges supérieures à 2 p. 100 le titre d'agglutination est inversement proportionnel à la concentration en globules rouges.

Les taux d'agglutination les plus élevés sont observés lorsque l'on fait les lectures après une heure et demie à trois heures de repos à la température de la glacière. Après une nuit, le taux d'agglutination est diminué.

(Institut Pasteur, Service des Virus [Dr P. LÉPINE].)

## ISOLEMENT D'UN VIRUS DE COBAYE A BRAZZAVILLE

(NOTE PRÉLIMINAIRE)

par A. PELLISSIER, J. CECCALDI et H. ARNOULT.

A l'occasion d'inoculations diverses, parfois sous-cutanées, mais surtout intrapéritonéales, nous avons obtenu chez le cobaye une maladie particulière, transmissible en série et due à un ultravirus.

Ce virus existe à l'état latent chez un certain nombre d'animaux de notre élevage et nous avons pu le mettre en évidence de deux façons différentes :

1° En inoculant à l'un de nos cobayes en bon état apparent, par voie intrapéritonéale, le produit obtenu en mélangeant le sang et le broyat des organes (foie, rein, rate, cerveau) d'un autre cobaye du même élevage, apparemment sain aussi, mais sacrifié à dessein.

Cet isolement a été obtenu de la sorte à trois reprises différentes.

2° Par des inoculations intrapéritonéales de lait stérile à différents cobayes. Ces modalités ont permis de mettre le virus en évidence : dans une première expérience, zéro fois sur 7 cobayes inoculés ; dans une deuxième expérience, une fois sur 7 cobayes inoculés ; dans une troisième expérience, deux fois sur 10 cobayes inoculés.

Ce virus ne s'est jamais manifesté spontanément et n'a pas déterminé de maladie apparente chez nos animaux ; il est seulement « sorti » à la faveur des diverses inoculations pratiquées.

Chez le cobaye, quelquefois dès le premier passage, toujours dès le second, l'animal fait une maladie mortelle. Après deux à trois jours



d'incubation, une forte réaction fébrile à 40-41° s'installe en plateau, dure de six à dix jours et l'animal meurt en hypothermie. L'amaigrissement est rapide et important : perte en moyenne du tiers du poids initial. Dès le troisième jour, on constate une polynucléose neutrophile à 70-80 p. 100 qui dure jusqu'à la mort. A l'autopsie, les animaux présentent un exsudat péritonéal filant, plus ou moins important, mais toujours net et une congestion avec hypertrophie de la rate. Les autres organes ne présentent rien de spécial. Microscopiquement, on note un peu de congestion et de stase au niveau du foie et des reins. La rate présente une congestion intense et une forte réaction macrophagique.

Les frottis de péritoine et de vaginale montrent des inclusions situées dans le cytoplasme et le noyau de grandes cellules endothéliales. Les affinités tinctoriales de ces inclusions varient avec les passages. Au cours des 2 ou 3 premiers passages, ces inclusions, arrondies, se présentent sensiblement comme les « corps homogènes » des virus rickettsiens. Elles sont colorées en bleu noir au Giemsa et en rouge sombre au Macchiavello. Puis, au cours des passages suivants, ces éléments ne sont plus colorés par le Giemsa qui les montre pour ainsi dire en « négatif ». Le Macchiavello les colore alors en rose. Ces inclusions sont toujours très nombreuses et de tailles inégales.

Les passages sont régulièrement positifs après inoculation de produits virulents filtrés sur Seitz et reconnus stériles. Tous les organes sont virulents : foie, rate, poumon, cerveau et sang. Le maximum de virulence semble exister dans la rate et le cerveau. Ces organes sont d'une virulence normale après une dilution à 1/100.000.

Chez 2 *singes* cercopithèques et chez 2 *lapins*, nous avons constaté une maladie fébrile mortelle en quinze à vingt jours, accompagnée d'amaigrissement considérable. Par contre, 4 *rats* blancs n'ont rien présenté.

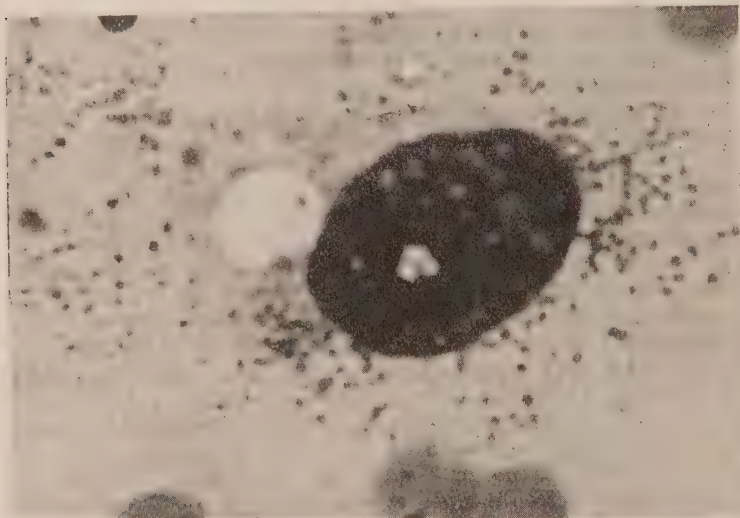
Chez la *souris*, il y a lieu d'étudier diverses voies d'inoculation. Par voie *intrapéritonéale* et par *instillation nasale*, 50 p. 100 des animaux inoculés meurent entre le sixième et le huitième jour en présentant une certaine excitation. A l'autopsie, on trouve dans la moitié des cas un peu de liquide péritonéal et pleural. Les frottis de péritoine montrent de rares inclusions du type de celles constatées chez le cobaye. Dans 2 cas, les frottis de poumon et d'exsudat pleural nous ont montré de grands monocytes dont le cytoplasme était bourré de petits éléments arrondis, colorés en bleu foncé au Giemsa et en rouge au Macchiavello, et que l'on peut considérer comme les *corps élémentaires* du virus (fig. 1).

Par inoculation *intracérébrale*, on obtient une maladie transmissible en série et régulièrement mortelle en six à huit jours. Il s'agit d'une méningo-encéphalite caractérisée cliniquement par des convulsions et des crises épileptiformes, réaction habituelle de la souris à toute méningo-encéphalite.

Les lésions anatomo-pathologiques au niveau du cerveau sont constantes et consistent en une méningo-encéphalite à cellules rondes et à polynucléaires, avec congestion et stase capillaire. Dans les autres organes elles sont variables, avec cependant toujours un certain degré de congestion du foie, de la rate et des reins et parfois des lésions

dégénératives du parenchyme rénal et hépatique, accompagnées de nodules inflammatoires à polynucléaires.

Ce virus de cobaye se montre différent de la « peste des cobayes à virus filtrable » décrite par Romer, puis par Gasperi et Sangiorgi. Il s'agit là d'une maladie atteignant la moelle et s'accompagnant de paralysies. Il se montre également différent de celui décrit par Jonesco-



Corps élémentaires du virus de cobaye. Exsudat pleural. Coloration Giemsa.  
(Gross. : 2.400. Service photographique de l'Institut Pasteur.

Mihaiesti qui donne des lésions assez particulières des surrénales et des ganglions lymphatiques. Il ne peut être non plus question de la « pneumopathie du cobaye » de P. Lépine et M<sup>lle</sup> Sautter.

Par contre, la transmission du virus à la souris et la constatation de corps élémentaires chez cet animal ayant la morphologie et les affinités tinctoriales des « Miyagawella » nous incitent à penser que nous avons affaire à un virus du groupe psittacose-lymphogranulomatose vénérienne.

(Institut Pasteur de Brazzaville.)

## SEPTICÉMIE DUE A *CLOSTRIDIUM ŒDEMATIENS* TYPE A CHEZ LES TORTUES RAYÉES DE MADAGASCAR (*TESTUDO RADIATA* SHAW)

par A.-R. PRÉVOT, Ach. URBAIN, J. NOUVEL et GENEVIÈVE PIETTE.

Au cours des années 1949 et 1950, une épizootie particulièrement grave a sévi sur des tortues de la ménagerie des reptiles du Muséum National d'Histoire Naturelle.

Au total, 7 tortues ont été atteintes et toutes ont succombé à l'infection (6 *Testudo radiata* Shaw et 1 Cistude : *Emys orbicularis* L.).

Ces animaux sont généralement trouvés morts dans leur enclos sans avoir présenté rien d'anormal si ce n'est, dans quelques cas, un peu d'inappétence et une certaine difficulté à se déplacer.

A l'autopsie, on note, dans tous les cas, des lésions identiques. Le cadavre présente un œdème crépitant du cou et des membres. La production de gaz est si importante que, chez certains sujets, elle a provoqué un éclatement de la carapace. Un liquide sanguinolent et spumeux s'échappe de la cavité buccale et de l'anus. A l'ouverture du cadavre, on constate une congestion généralisée de tous les organes ; ils sont dilatés par des gaz accumulés dans leurs tissus, ceux-ci sont friables, très faciles à dilacérer ; ils sont criblés de foyers hémorragiques leur donnant une teinte rouge noirâtre. Dans certains cas, il a été noté sur l'intestin une infiltration séro-gélatineuse rouge foncé qui, à l'incision, laisse échapper en abondance des gaz. Des frottis d'organes ont montré quelques rares gros bacilles Gram-positifs.

L'examen bactériologique a été pratiqué en partant du foie et des œdèmes sous-cutanés du cou. L'ensemencement a été fait en bouillon sous huile de vaseline, avec un cube de blanc d'œuf et un cube de foie.

Une culture très ténue se développa lentement à 37°, qui, repiquée en gélose profonde VF pour isolement, fit la preuve de sa pureté. Par repiquage d'une colonie bien isolée en bouillon VF glucosé, une lignée fut obtenue qui permit l'identification du germe. Cette identification fut très difficile, car il s'agit d'une souche très anormale de *Cl. œdematiens*. Voici les principales anomalies de cette souche : 1° Sa thermorésistance est beaucoup plus faible que celle de l'espèce-type ; elle ne résiste que deux minutes à 100°. 2° L'odeur est extrêmement faible, à peine perceptible. 3° L'auto-agglutination en bouillon VF est lente et incomplète. 4° La coagulation du lait est lente et incomplète. 5° La gélatine n'est pas liquéfiée. 6° Le type fermentaire est anormal : propionique-butyrique-lactique et absence d'acétoïne. 7° Le pouvoir pathogène expérimental est faible pour le cobaye ; il faut 1 cm<sup>3</sup> de culture pour tuer le cobaye. Toutefois, le tableau anatomo-pathologique est très caractéristique : volumineux œdème gélatineux rosé, où on retrouve le germe par examen direct et par ensemencement.

C'est l'étude de la toxine qui a pu fixer le diagnostic. Mais ici encore, de grosses difficultés surgirent, car la toxine est très faible et d'apparition très inconstante. C'est en culture sur bouillon VF glu-

cosé à 5 p. 1.000 après quatre jours d'incubation à 37° que plusieurs fois apparut cette toxine faible dont il a fallu 0,25 cm<sup>3</sup> par voie veineuse pour tuer la souris de 20 g. en deux heures et 0,5 cm<sup>3</sup> par voie sous-cutanée pour produire l'œdème gélatineux mortel pour cet animal. Cette toxine est faiblement hémolytique : il faut 0,2 cm<sup>3</sup> pour hémolyser le test habituel de globules rouges de mouton. Mais cette toxine est entièrement neutralisée par le sérum anti-œdematiens de l'Institut Pasteur, dont 0,1 cm<sup>3</sup> neutralise 2 DMm. Il s'agit donc bien de *Cl. œdematiens* type A, mais cette souche, très anormale par ses caractères culturels et biochimiques, fait penser à une variété fermentaire nouvelle. A ce sujet, plusieurs remarques sont à faire.

L'origine de cette infection est vraisemblablement intestinale, comme dans l'hépatite nécrosante du mouton. Mais ici, par la faiblesse de la toxine les phénomènes diastatiques et hémolytiques, *in vivo*, prennent le pas sur les phénomènes toxiques, comme chaque fois qu'on voit une infection des animaux (spontanée ou expérimentale) par une souche peu toxigène de *Cl. œdematiens*. Ici, la prédominance des phénomènes enzymatiques sur les phénomènes toxiques est telle que l'on a pu observer l'éclatement de la carapace par le dégagement gazeux. Dans les enzooties du mouton à *Cl. œdematiens*, quand la souche est très toxique, on ne voit jamais de dégagement gazeux. Il se peut fort bien que les anomalies de cette souche soient le résultat d'une mutation provoquée par le passage sur la tortue. On ne connaissait, en effet, jusqu'ici, que des maladies spontanées des mammifères provoquées par *Cl. œdematiens*. Cette observation méritait donc d'être relatée puisqu'elle étend aux reptiles le champ d'action pathogène de cet anaérobie — par ailleurs très répandu et très fréquent — et en fait connaître une variété biochimique nouvelle.

(Institut Pasteur. Service des Anaérobies  
et Laboratoire d'Ethologie des Animaux sauvages  
du Muséum National d'Histoire Naturelle.)

## ÉTUDE D'UNE SOUCHE DE *PLECTRIDUM CARNIS* (KLEIN) PRÉVOT ISOLÉE D'UNE ENZOOTIE DANOISE DU VISON

par D. SOMPOLINSKY.

Dans un travail antérieur (1) nous avons exposé l'épidémiologie, la symptomatologie et l'étiologie d'une enzootie ayant provoqué la mort de 20 visons dans une ferme d'élevage au Danemark. La maladie, d'allure aiguë et rapide, presque toujours fatale en quelques heures, se présentait comme une septicémie avec signes généraux graves, entérite hémorragique ou catarrhale et infarctus du rein. Des lésions et du sang du cœur fut isolé une dizaine de fois un anaérobic pathogène

(1) D. SOMPOLINSKY, *Skand. Veter. Tidskr.*, 1948, **38**, 506.



que nous avons identifié à l'espèce décrite par Klein en 1903, sous le nom *Bacillus carnis*, appelée aujourd'hui *Clostridium carnis*, par Bergey et al. et *Plectridium carnis*, par Prévot (2). Nous avons voulu compléter l'étude de cette souche par la technique de l'Institut Pasteur.

La souche 522 B que nous avons apportée du Danemark sporule facilement en bouillon Vf glucosé et en gélose profonde. Ces spores sont ovales, de grande taille et presque toujours terminales. Rarement, elles prennent l'aspect subterminal. Le diagnostic de genre est donc délicat, mais l'observation de nombreuses spores montre qu'en général, il s'agit d'une spore plectridienne et nous préférons ainsi adopter la classification de ce germe dans le genre *Plectridium*.

Les principaux caractères différentiels de notre souche sont :

- 1° Sa faible thermorésistance : quinze minutes à 70°.
- 2° Son pouvoir réducteur élevé (rouge neutre et safranine réduits).
- 3° Le dégagement gazeux important et l'odeur fétide des cultures.
- 4° Les colonies ouatées de grande taille en gélose profonde Vf glucosée.

5° La fermentation acide et gazeuse des glucides suivants : glucose, lévulose, maltose, saccharose, galactose, lactose, mannose, salicine, dextrine et arbutine.

6° *Caractères biochimiques*. — Les nitrates ne sont pas réduits en nitrites. Il produit 0,17 g. d'ammoniac par litre, des traces d' $\text{SH}_2$  ; des amines volatiles ; les acides acétique, butyrique et lactique.

7° Son pouvoir pathogène expérimental est variable ; il faut 0,2 à 2 cm<sup>3</sup> de culture par voie intramusculaire pour provoquer un œdème local chez le cobaye et une septicémie. Les autres animaux sont plus sensibles : axolotl, grenouille, moineau, renard, chat, chien, vison, furet, lapin et souris sont tués par l'injection de culture. Il est hémolytique pour les espèces sensibles ci-dessus ; non hémolytique pour les globules rouges d'homme, de mouton, de cheval, de pigeon et de poulet. Il sécrète une petite quantité d'hyaluronidase.

Enfin, il est très sensible à la pénicilline (inhibé par 1 unité au centimètre cube) et à la sulfanilamide.

Ainsi, la souche danoise ne diffère de la souche africaine dont l'étude a permis de rédiger la description récente de Prévot que par l'absence de production d'aldéhyde, de crésol et d'indol.

Nous considérons donc la souche danoise comme une variété biochimique de l'espèce-type.

Il est intéressant de constater que cette espèce, initialement isolée par Klein dans la viande putréfiée, puis par Prévot dans les sols forestiers de Côte d'Ivoire et à laquelle ces auteurs, tout en ayant reconnu son pouvoir pathogène expérimental (œdème hémorragique mortel), n'avaient trouvé aucun pouvoir pathogène spontané, a été retrouvée par nous comme agent étiologique d'une enzootie mortelle des visons d'élevage. Sa présence dans la terre nous fait penser que la voie d'introduction est entérale et que le mécanisme de l'infection est semblable à celui des nombreuses infections générales mortelles causées par les anaérobies telluriques.

(Institut Pasteur. Service des Anaérobies.)

(2) A.-R. PRÉVOT, *Manuel de classification des anaérobies*, 2<sup>e</sup> édit., 1948, 207.

## TOXICITÉ PÉRIODIQUE DES SOLUTIONS DE TOXINES PRÉCIPITÉES DE *BACT. AEROGENES*

par A. KREGUER.

Les souches 304 et Lewis que nous avons utilisées dans ce travail appartiennent au type II de *Bact. aerogenes* ; elles produisent une faible toxine après cinq à six jours de culture à 37° en bouillon Vf : les filtrats injectés par voie intraveineuse aux souris tuent généralement à 1/2 ou 1/10 de centimètre cube. Lorsqu'on précipite ces filtrats par le sulfate d'ammonium à saturation, le précipité obtenu, titré aussitôt après la dessiccation dans le vide, présente une toxicité faible (d. m. m. 0,5 à 3 ou 4 mg.) qui ne reste pas stable au cours de la conservation et généralement s'atténue au cours des premiers jours. En recherchant le moyen de réactiver ces toxines, nous avons constaté que, partant d'une même toxine précipitée, les solutions faites à des dates différentes présentent des toxicités différentes, ainsi, par exemple, une toxine (Lewis, 25 octobre 1948) ayant une dose m. m. de 0,5 mg. aussitôt après la dessiccation, ne tue la souris qu'à la dose de 1,25 mg. après vingt-huit jours ; après quarante-trois jours, elle est à peine toxique à la dose de 4 mg., tandis que le quarante-sixième jour elle tue à la dose de 1 mg. Nous avons, d'autre part, observé des variations analogues en titrant à des dates différentes des solutions préparées à partir de ces toxines précipitées et conservées dans le frigidaire.

Ces faits nous ont conduit à examiner la toxicité de ces solutions au cours de leur conservation et nous exposons brièvement ici les résultats que nous avons obtenus.

Dans tous nos essais, nous avons préparé les solutions en dissolvant 0,3 g. de toxine précipitée dans 30 cm<sup>3</sup> d'eau physiologique. Aussitôt après la dissolution, nous avons centrifugé rapidement et filtré sur bougie L3. Les solutions, réparties en tubes, sont conservées dans le frigidaire et titrées, à divers intervalles de temps, sur souris (de 17 à 20 g.), par voie intraveineuse. Lesensemencements de ces filtrats et des prélèvements de cerveaux de souris mortes après l'inoculation de ces filtrats ne nous ont jamais donné de cultures.

Nous avons étudié de nombreuses solutions des 6 toxines précipitées préparées avec les souches 304 et Lewis. Deux de ces toxines nous ont donné des solutions ne tuant pas les souris à la dose de 0,25 cm<sup>3</sup> (correspondant à 2,5 mg. de toxine) au cours des titrages répétés. Par contre, les solutions des 4 autres toxines ont présenté une périodicité toxique curieuse : une solution ne tuant pas la souris à la dose de 0,25 cm<sup>3</sup> aussitôt après la filtration, peut devenir nettement toxique vers le 4<sup>e</sup> ou 5<sup>e</sup> jour, mais généralement vers le 7<sup>e</sup> ou 8<sup>e</sup> jour et tuer à la dose de 1/10 de centimètre cube, faiblir les jours suivants et redevenir à nouveau nettement toxique vers le 13<sup>e</sup> ou 14<sup>e</sup> jour. Ainsi, par exemple : une solution de toxine Lewis ne tue pas à la dose de 0,25 cm<sup>3</sup> aussitôt

après sa préparation ; le 7<sup>e</sup> jour, elle tue aux doses de 1/10 et 0,25 cm<sup>3</sup>, le 8<sup>e</sup> jour elle ne tue qu'à la dose de 0,25 cm<sup>3</sup> ; le 12<sup>e</sup> jour, à cette même dose elle ne tue qu'une souris sur deux et par contre, le 13<sup>e</sup> jour, elle tue à nouveau aux doses de 0,25 et de 1/10 de centimètre cube.

Certaines solutions peuvent ne pas présenter de toxicité périodique au cours des premiers jours de leur conservation, mais devenir très nettement toxiques vers le 13<sup>e</sup>-15<sup>e</sup> jour, puis du 27<sup>e</sup> au 30<sup>e</sup> jour, etc. Par exemple : une solution de la toxine Lewis 3/549 se montre atoxique les 7<sup>e</sup>, 8<sup>e</sup> et 9<sup>e</sup> jours. Titrée les 27<sup>e</sup>, 28<sup>e</sup> et 29<sup>e</sup> jours, elle tue les souris à 0,25 et 0,1 cm<sup>3</sup>, puis se montre à nouveau atoxique le 41<sup>e</sup> jour, toxique le 42<sup>e</sup>.

La périodicité toxique persiste longtemps dans les solutions : nous avons examiné une solution conservée depuis cent vingt jours ; elle tuait aux doses de 0,25 et 0,1 ; le 129<sup>e</sup> jour, injectée aux mêmes doses, elle ne tuait que la moitié des souris.

Cette périodicité s'observe aussi lorsque les solutions sont gardées à la température du laboratoire.

Un chauffage de dix minutes à 100° ne l'abolit pas. Ainsi, partant d'une même solution, nous avons chauffé une partie pendant dix minutes à 100° ; les deux solutions, injectées à la dose de 0,1 cm<sup>3</sup>, se sont montrées à peine toxiques les 6<sup>e</sup>, 7<sup>e</sup>, 12<sup>e</sup> et 13<sup>e</sup> jours, mais le 14<sup>e</sup> jour, toutes deux ont tué à cette dose.

Nous avons observé les mêmes variations de toxicité lorsque nous avons utilisé du bouillon Vf (pH : 7,6) comme solvant au lieu de l'eau physiologique.

Les souris recevant les solutions toxiques présentent les symptômes observés habituellement après l'injection des toxines colibacillaires : période d'incubation de trente minutes à une heure, puis dyspnée, diarrhée souvent hémorragique. Certains animaux meurent en quelques heures, d'autres ne présentent plus de diarrhée, mais la perte du tonus musculaire et une grande prostration. Parfois les membres peuvent être agités par des tremblements, ou bien l'animal a ses pattes postérieures allongées et inertes (mais non paralysées). La mort survient en moins de vingt à vingt-quatre heures.

A l'autopsie on constate peu de changement à part une vaso-dilatation générale marquée. Les poumons sont souvent très congestionnés, ainsi que les intestins qui contiennent fréquemment un liquide jaune rosé.

Un essai préliminaire nous a montré que les solutions au stade toxique, injectées par voie sous-cutanée aux souris (4 injections à sept jours d'intervalle), protègent ces animaux contre l'injection intraveineuse de plusieurs doses mortelles de solution toxique.

Dans une publication ultérieure plus détaillée, nous exposerons la suite de nos recherches.

*Résumé.* — Les solutions des toxines précipitées préparées avec les souches de *Bact. aerogenes* 304 et Lewis présentent, au cours de leur conservation, une périodicité toxique.

(Institut Pasteur.)

## CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA PHYSIOLOGIE DES BACILLES ACIDO-ALCOOLO-RÉSISTANTS

### I. — LES ÉCHANGES GAZEUX

par JEAN DESBORDES et ÉTIENNE FOURNIER (\*).

Continuant l'étude de la physiologie des bacilles acido-alcoolo-résistants, entreprise sous la direction de Jean Paraf (1) et en particulier celle de leur équipement enzymatique, nous avons déjà noté avec d'autres auteurs (2) l'intérêt qui s'attache à la connaissance des échanges gazeux signant le métabolisme de ces germes. Or, ces échanges sont mal connus bien qu'un point extrêmement important : celui de la nécessité de la présence d'oxygène libre pour la croissance du bacille de Koch, ait été abordé à plusieurs reprises (3) sans que nous puissions en tirer des conclusions bien nettes.

Nous avons repris ce problème en étudiant d'abord diverses souches acido-alcoolo-résistantes par la méthode de la respiration de Warburg.

Les résultats que nous exposons dans cette note ont été réalisés sur divers germes repiqués depuis trois semaines sur pomme de terre glycélinée et préparés suivant la technique habituelle des germes vivants non proliférants [resting bacteria] (4), lavage banal, puis centrifugation, oxygénation par barbotage en courant d'air, remise en suspension en solution salée et tamponnée de pH : 7,0.

TABLEAU I. — Etude des échanges respiratoires de bacilles A. A. R.  
(Méthode de Warburg).

NOMS DES SOUCHES	CONSOMMATION D'O <sub>2</sub> par 24 heures, en centimètres cubes	
	sans accélérateur de la respiration	avec accélérateur type PAS ou benzoate de soude 50γ/cm <sup>3</sup>
B K., souche virulente . . . . .	32 à 35	58 à 62
BCG, culture jeune de 15 jours . . . . .	27 à 29	46 à 54
BCG, culture âgée, abandonnée 6 à 10 mois.	4 à 15	5 à 17

(\*) Travail subventionné par l'Institut national d'Hygiène.

(1) Jean PARAF, Jean DESBORDES et coll., *Etudes chimiques sur la tuberculose*, 1 vol. Exp. scient. franç., édit., Paris 1948.

(2) NOVY et SOULE, *J. inf. Dis.*, 1925, **36**, 169 et 1926, **37**, 77.

(3) CARPER, *Am. Rev. Tuberc.*, 1927, **15**, 65.

(4) Techniques classiques de QUASTEL et WEETHAM.



Parmi nos divers résultats, voici une expérience effectuée avec trois cultures différentes :

1° Une culture récente de souche de bacille de Koch virulent isolée d'un exsudat pleural d'une malade du service, testée sur le cobaye et conservée au laboratoire.

2° Une culture âgée de quinze jours de BCG provenant de l'Institut Pasteur de Paris.

3° Une culture âgée de six à dix mois de BCG aimablement fournie par le laboratoire du professeur Sartory, que nous remercions ici.

Chaque cellule de Warburg contenait environ 0,010 g. de bacilles.

Naturellement, il a été vérifié qu'un témoin contenant uniquement le milieu salé tamponné avec le même accélérateur ne donnait lieu à aucun dégagement gazeux.

Soulignons avant tout que ces diverses souches sont plus ou moins modifiées par l'utilisation d'un milieu non synthétique, tel que la pomme de terre glycinée, et présentent de ce fait des *caractéristiques qui sont propres aux conditions de cultures antérieures utilisées pour conserver la souche* et, en particulier, au milieu de repiquage utilisé immédiatement avant l'examen pratique.

On peut déduire de nos résultats que :

1° Les cultures vieilles de certains bacilles A. A. R. entraînent une baisse considérable de la consommation d'oxygène de ces micro-organismes.

2° Comme le soulignait Fromageot (5), il y a une différence nette de consommation d'oxygène entre une souche de B. K. virulente et une souche non virulente, la souche virulente consommant le plus.

De même, nous retrouvons ici un autre fait déjà connu ; pour une souche de virulence connue, le vieillissement de la culture entraîne une baisse notable de consommation d'oxygène. Ceci est vrai également pour le bacille de Koch.

3° Si l'on utilise un des accélérateurs de respiration des B. K. préconisés par Bernheim (6) ou par Lehmann (7) on exagère facilement la consommation d'oxygène du B. K. et BCG jeune, mais les corps utilisés ici sont sans action très notable sur une souche atténuée ancienne (BCG).

(Laboratoire de Recherches phthisiologiques, Hôpital Bichat.

[Service du D<sup>r</sup> Jean PARAF].)

(5) Conférence Inst. Pasteur, *L'équipement enzymatique des bactéries*, 5 décembre 1945.

(6) BERNHEIM, *J. Bact.*, 1941, **41**, 387.

(7) LEHMANN, *Lancet*, 1946, **250**, 14.

## CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA PHYSIOLOGIE DES BACILLES ACIDO-ALCOOLO-RÉSISTANTS

### II. — L'ÉQUIPEMENT ENZYMATIQUE, LA VIRULENCE ET LES INDICATEURS COLORÉS DE rH

par JEAN DESBORDES et ÉTIENNE FOURNIER (\*).

Les enzymes d'oxydo-réduction occupent une place de choix dans l'équipement enzymatique des bacilles du genre *Mycobacterium*. Leur étude peut être abordée avec fruit en utilisant la méthode de respiration en cellule de Warburg (1) ; nous proposons ici l'usage des colorants indicateurs d'oxydo-réductions pour analyser plus finement leur comportement.

En effet, chacun de ces indicateurs peut être réduit si les réactions de dégradation de l'organisme bactérien atteignent un rH suffisamment bas. En opérant avec une gamme d'indicateurs colorés, on pourra mettre éventuellement en évidence, par des paliers de décoloration successifs, des équipements enzymatiques différents (s'ils existent) et par là classer des souches présentant diverses caractéristiques microbiologiques.

On sait que les micro-organismes les plus adaptés à l'aérobiose ne peuvent pas réduire les indicateurs à rH bas situés. Inversement, les plus adaptables à l'anaréobiose sont souvent sans action sur les corps nécessitant des intermédiaires d'oxydo-réduction à rH élevé.

Lorsque le rH se situe à un point où le rapport :  $\frac{\text{corps réduit}}{\text{corps oxydé}}$  est nettement différent de zéro, le phénomène se traduit par une décoloration partielle et stable.

Récemment, différents auteurs (2) ont abordé cette question, mais leurs résultats fragmentaires ne permettent pas une conclusion d'ensemble. Nous avons étudié diverses souches bien différentes avec des indicateurs variés correspondant à des rH éloignés en utilisant la technique aujourd'hui classique des germes lavés, vivants mais non proliférants [resting bacteria] (3), à pH 7,0, en tubes de Thunberg (37°. Substrat : glucose).

Nous avons pris comme matériel d'étude, soit des souches personnelles de B. K. virulents isolés de malades du service du Dr Jean Paraf, soit des souches provenant du laboratoire du professeur Sartory, ou aimablement fournies par le professeur Hauduroy en provenance de la Mycothèque de l'Institut d'Hygiène de Lausanne.

Il est intéressant de noter que ces diverses souches étaient plus ou

(\*) Travail subventionné par l'Institut national d'Hygiène.

(1) DESBORDES et FOURNIER, ces *Annales*, 79, 208.

(2) Voir en particulier H. BLOCH, *Am. Rev. Tuberc.*, 1950, 64, 270.

(3) Techniques classiques de QUASTEL et WEETHAM.

moins profondément modifiées par des cultures longues ou l'utilisation volontaire de milieux pauvres.

Les résultats que nous décrivons dans cette note sont obtenus après un repiquage sur pomme de terre glycinée. Nous décrirons ultérieurement ceux que nous obtenons avec des cultures obtenues uniquement sur milieux synthétiques.

Parmi les indicateurs de rH utilisés, nous en avons retenu surtout deux :

Le dichloroindophénol (rH 22) et le bleu de méthylène (rH 14) (Tabl. I.).

**TABEAU I. — Réactions observées avec diverses souches de bacilles A. A. R. et divers indicateurs colorés de rH.**

SOUCHES	DICHLOROPHÉNOL- INDOPHÉNOL	BLEU DE MÉTHYLENE
B. K., virulent (souche Jean Paraf) . . . . .	O	0
BCG., culture fraîche. . . .	Décoloration partielle.	0
B K., souche Courmont. . . .		0
Souche F <sub>3</sub> de Sartory, Schuster et Desbordes, pseudotuberculeux . . . . .	Décoloration partielle.	0
Para-tuberculeux, souche 149 de Lausanne (Prof. Hauduroy) . . . . .	Décoloration.	Décoloration partielle.
Para-tuberculeux, souche 60 de Lausanne (Prof. Hauduroy) . . . . .		Décoloration partielle.
Para-tuberculeux, souche 88 de Lausanne (Prof. Hauduroy) . . . . .		Décoloration totale en 5 minutes.
BCG., culture âgée (Institut Pasteur) . . . . .	Décoloration totale.	Décoloration totale en 4 minutes.
Para-tuberculeux, d'après Bloch (U.S.A.) . . . . .		Décoloration totale en 2 minutes.

N.-B. La décoloration du liquide s'accompagne souvent, dans une première phase, d'une fixation du colorant sur les germes, suivie dans une deuxième phase de leur décoloration.

Il nous semble que l'on peut tirer les conclusions suivantes :

1° Il est possible de classer assez correctement les bacilles A. A. R. suivant leur virulence par le simple examen de leur comportement, sans lavage chimique ni dégraissage préalable.

2° Il nous semble intéressant de rapprocher nos expériences de la méthode proposée par Dubos (4), d'identification de la virulence [méthode dite au rouge neutre, vulgarisée en Europe par Hauduroy] (5). On sait que cette méthode consiste à imprégner des bacilles, lavés à l'alcool méthylique, par une solution de rouge neutre dans un milieu tampon alcalin.

On comprend maintenant pourquoi les bacilles, facilement per-

(4) DUBOS, *Am. Rev. Tuberc.*, 1948, 53.

(5) HAUDUROY et coll., *C. R. Acad. Sci.*, 1949, 228, 781.

méables aux colorants, offrent des différences remarquables de couleurs suivant leur équipement enzymatique initial (imprégnation rouge ou jaune).

3° Ces réactions sont à notre avis tout à fait comparables aux observations que nous venons de décrire sur le bleu de méthylène ou l'indophénol et caractérisent les enzymes d'oxydo-réduction du bacille, confirmant les hypothèses émises sur les diastases du bacille de Koch, par Paraf, Desbordes et leurs collaborateurs (6).

(Laboratoire de Recherches phtisiologiques. Hôpital Bichat  
[Service du Dr Jean Paraf].)

## CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA PHYSIOLOGIE DES BACILLES ACIDO-ALCOOLO-RÉSISTANTS

### III. — L'ACTION DU P.A.S. SUR LES ENZYMES DU BACILLE DE KOCH

par JEAN DESBORDES et ÉTIENNE FOURNIER (\*).

Dans des notes précédentes nous avons attiré l'attention sur l'intérêt qui s'attache à l'étude des échanges gazeux et de l'action des enzymes d'O-R des germes A. A. R. sur certains indicateurs colorés de rH (1).

Par ailleurs, nos recherches en cours, sur ces mêmes bacilles, soulignent l'intérêt qui s'attache aux produits de dégradation de l'acide P. A. S. (2), dont l'activité antibacillaire est maintenant bien connue, substances que nous tendons à préciser en ce moment.

I. — Dans une première partie nous avons étudié le comportement de diverses souches de *bacilles de Koch*, les unes virulentes (souche personnelle provenant d'un pus pleural isolé dans le service du Dr Jean Paraf), les autres de virulence atténuée (BCG, Service de l'Institut Pasteur, Paris), en présence ou non de P. A. S.

Environ 10 mg. de bacilles cultivés depuis trois semaines sur pomme de terre glycélinée sont mis en suspension suivant la technique habituelle et introduits dans une cellule de Warburg.

Le P. A. S. exagère la consommation d'oxygène d'une manière à peu près identique dans nos expériences, qu'il s'agisse de souche virulente ou atténuée.

*Mais il est pratiquement sans action sur une souche atténuée ancienne.*

II. — Dans une seconde partie, nous avons étudié le comportement du P. A. S. sur différentes souches d'A. A. R. (B. K. virulent, B. K. atténué (BCG ou Courmont), para-tuberculeux chromogènes, para-tuberculeux non chromogènes, pseudo-tuberculeux) en présence d'indicateurs colorés de rH, en tubes de Thunberg.

Nous avons déjà montré que le comportement des bacilles vis-à-vis de

(6) PARAF et DESBORDES, *Rec. Trav. Inst. nat. Hyg.*, 1948, **3** (volume 2), 518.

(\*) Travail subventionné par l'Institut national d'Hygiène.

(1) DESBORDES et FOURNIER, ces *Annales*, 1950, **79**, 208-210.

(2) Acide p-amino-salicylique.



TABLEAU I. — Action du P. A. S.  
sur la consommation d'O du bacille de Koch.

SOUCHES (environ 10 mg. par cellule de Warburg)	AUGMENTATION de consommation de d'O <sup>2</sup> en 24 heures et en cm <sup>3</sup> entre une émulsion sans P. A. S. et une avec 50 γ de P. A. S./cm <sup>3</sup>
B. K. virulents. . . . .	+ 21,5
BCG, culture jeune (15 jours) . . . . .	+ 22
BCG, culture âgée (10 mois) . . . . .	+ 1,5

ces indicateurs de rH permettait d'en faire un classement cohérent au point de vue de leurs propriétés biologiques (3).

Dans la présente note, nous étudions l'influence du P. A. S. sur ces décolorations. Parmi nos divers résultats, nous relevons dans le tableau suivant, l'action du P. A. S. sur la décoloration du bleu de méthylène. Des résultats semblables sont obtenus avec l'indo-phénol.

TABLEAU II. — Action du P. A. S. sur les décolorations observées par  
action de diverses souches de B. K. sur un indicateur coloré de rH.

SOUCHES	DÉCOLORATION du bleu de méthylène	DÉCOLORATION du bleu de méthylène avec 10 γ de P. A. S.	DÉCOLORATION du bleu de méthylène + 1.000 γ de K. C. N.
souche virulente (souche en Paraf) . . . . .	0	0	Décoloration en 4 mi- nutes, même à l'air.
culture fraîche (Ins- tit Pasteur) . . . . .	0	0	Id.
do-tuberculeux F <sub>3</sub> (souche tory, Schuster et Des- des) . . . . .	0	0	Id.
souche Courmont . . . . .	±	0	Id.
tuberculeux, Lausanne 149 duroy) . . . . .	±	0	Id.
tuberculeux, Lausanne 60 duroy) . . . . .	Décoloration incomplète.	Décoloration difficile- ment appréciable.	Id.
tuberculeux, Lausanne 8R duroy) . . . . .	Décoloration totale en 6 minutes.	Décoloration totale en 7 minutes.	Id.
culture ancienne (Ins- tit Pasteur) . . . . .	Décoloration totale en 4 minutes.	Décoloration totale en 4 min. 30.	Id.

On voit que les variations dues au P. A. S. ne sont nettement appréciables que chez les germes décolorant mal le bleu de méthylène. Elles sont à peine sensibles chez les germes le décolorant bien. Cependant, lorsqu'on laisse rentrer de l'air dans le tube de Thunberg après décolo-

ration du bleu de méthylène, celui-ci se recolore par simple agitation, mais beaucoup plus rapidement lorsque le milieu externe contient du P. A. S. Cette recoloration est observée même en présence de cyanure de K qui, on le sait, inhibe seulement la respiration bactérienne.

Nous avons, de plus, observé que, dans nos conditions expérimentales, l'aneurine joue un rôle comparable lorsqu'on l'ajoute au milieu. Avec l'indophénol, le P. A. S. joue un rôle analogue : retard de la décoloration du réactif et palier de décoloration à un taux moins marqué que lorsque le milieu ne contient pas de P. A. S. Cette réaction est plus facile à observer avec cet indicateur qu'avec le bleu de méthylène. Le cyanure de potassium n'inhibe pas les enzymes transporteurs d'hydrogène qui sont, par cette méthode, révélés chez le bacille de Koch virulent.

CONCLUSIONS. — De tout ceci et de nos recherches antérieures, on peut conclure :

1° Le P. A. S. peut agir sur les systèmes enzymatiques d'O-R des bacilles virulents et jeunes et produire une accélération de la consommation d'O<sub>2</sub>.

2° Le P. A. S. du milieu extérieur au bacille peut se comporter comme un transporteur d'oxygène pour les micro-organismes.

3° Les bacilles de Koch ne peuvent dégrader le benzène, l'aniline et de nombreux dérivés aromatiques comme l'ont montré divers auteurs (4).

4° L'introduction de substituants -OH et -COH rend, dans certains cas (P. A. S. en particulier), cette dégradation possible. Il est donc intéressant de connaître les produits de dégradation du P. A. S.

5° L'un de nous, en effet, émet l'hypothèse que ce corps est un substrat que le bacille de Koch pourrait utiliser de préférence aux produits de dégradation cellulaires lors de l'action du bacille dans l'organisme. Par ailleurs, ce corps ou ses dérivés de dégradation possèdent une toxicité propre pour le bacille virulent. Il est probable qu'un autre phénomène est en jeu (inhibition de la reproduction du micro-organisme, par exemple, ou action toxique du P. A. S. ou de l'un de ses dérivés par une réaction de fixation sur certains intermédiaires réducteurs du métabolisme bactérien).

6° En conclusion générale des notes déjà publiées sur ce sujet (1, 3), nous tenons à faire remarquer que les équipements enzymatiques des divers bacilles du genre *Mycobacterium* semblent être constitués par des diastases voisines ou identiques. Des méthodes particulières (inhibiteurs ou accélérateurs de métabolisme) permettent de révéler sur chaque souche des propriétés enzymatiques très comparables. De même, il n'existe que des variations de degré d'aérobiose. Tout ce que nous avons observé est une nette modification de répartition des enzymes bactériens d'une souche à une autre. Le travail que nous présentons ici est l'ébauche d'un cadre pratique permettant de classer facilement par les réactions aux indicateurs colorés de rH à l'indophénol, au bleu de méthylène et au rouge neutre, la grande variété de bacilles acidoolcoolo-résistants du même genre *Mycobacterium*.

(Hôpital Bichat [Service du D<sup>r</sup> Jean Paraf].)

(4) Voir entre autres : BERNHEIM, *Science*, 1940, 92, 204.

## CONTRIBUTION A L'ÉTUDE ÉTIOLOGIQUE ET THÉRAPEUTIQUE DE L'ACNÉ JUVÉNILE

par PIERRE MERCIÈR et JEAN PILLET.

L'acné juvénile pose toujours aux spécialistes de diverses disciplines de multiples problèmes non résolus à l'heure actuelle. S'il est hors de conteste que le terrain dysendocrinien favorise la séborrhée, il est probable que ce sont des micro-organismes qui transforment la séborrhée en acné.

Après quelques auteurs (1), nous nous préoccupons d'étudier la flore bactérienne de l'acné dans ses diverses formes cliniques et nous pouvons immédiatement noter que deux germes se retrouvent avec constance, toujours associés, dans les divers éléments de l'affection, comédons, papules péripilaires ou pustules : ce sont *Corynebacterium acnes* et le staphylocoque.

Il est relativement facile de les mettre en évidence à partir d'un comédon, par exemple, mais la séparation des deux germes est, comme nous le verrons plus loin, beaucoup plus difficile.

*Technique d'isolement et de culture de Corynebacterium acnes.* — Le comédon, extrait entre deux vaccinostyles, par pression de la peau préalablement désinfectée à l'éther, est porté dans un mortier stérile contenant 2 à 3 cm<sup>3</sup> d'eau physiologique et un peu de sable stérile, ou dans un ballon contenant des perles de verre et également quelques centimètres cubes d'eau physiologique. Après dilacération du comédon, des dilutions des suspensions sont ensemencées dans le milieu suivant, dérivé de celui de Douglas et Gunter : peptone, 20 g. ; autolysat de levure, 5 g. ; glucose, 10 g. ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 g. ; cystéine, 1 g. ; gélose, 20 g. pour 1 litre d'eau distillée. Le pH est ajusté à 6,8 avant stérilisation. Le milieu ensemencé à 45° est réparti soit en boîtes de Petri qui, après refroidissement, sont placées sous une cloche où l'on fera le vide, soit en boîtes de Roux où l'on pourra faire passer un courant continu d'azote. Après deux ou trois jours de culture à l'étuve à 37° apparaissent de petites colonies rondes, lisses, de 1 à 4 mm. de diamètre, se colorant parfois ultérieurement en rose pâle.

*Morphologie.* — Ces colonies sont constituées de *Corynebacterium acnes* (microbacille de la séborrhée, *Bacillus acnes*), fins bacilles, ellipsoïdes, se groupant souvent par paires en forme de V. Ils sont immobiles, non sporulés et gardent fortement la coloration de Gram. La taille de ces éléments est d'environ 0,5 × 0,8 μ.

*Corynebacterium acnes* peut être cultivé exceptionnellement en aérobiose, par exemple sur le milieu gélosé et glucosé de Sabouraud. Dans ces conditions, il se présente sous forme de bacilles plus allongés :

(1) La bibliographie détaillée se trouve dans le mémoire récent de H. C. DOUGLAS et S. E. GUNTER, *J. Bact.*, 1946, 52, 15.

0,5  $\times$  2  $\mu$ . Il se développe aisément en tubes de Hall contenant le milieu liquide de même composition que celui décrit ci-dessus, en réduisant la proportion de gélose à 0,5 p. 1.000.

*L'étude des réactions biochimiques* que nous poursuivons montre que *Corynebacterium acnes*, au moins pour les 10 souches que nous avons isolées, fermente le glucose et l'arabinose, n'utilise pas le maltose, le lactose, le galactose, le mannitol et l'amidon. Il liquéfie la gélatine en dix jours.

Il s'avère malaisé de séparer *Corynebacterium acnes* du staphylocoque à partir des lésions élémentaires d'acné dans lesquelles les deux germes sont toujours associés. Nous n'avons pu y parvenir ni par vieillissement des cultures, ni par chauffage prolongé comme le recommandait Sabouraud. L'usage de milieux pénicillinés ne paraît pas, en l'état actuel de nos recherches, devoir être retenu en raison de la sensibilité des deux germes à cet antibiotique. Il semble toutefois que *Corynebacterium acnes* soit souvent plus résistant à la pénicilline que le staphylocoque. Peut-être l'emploi d'un phage spécifique permettrait-il de réaliser rapidement l'isolement du *Corynebacterium*.

*Le staphylocoque de l'acné.* — Les caractères biologiques des staphylocoques nous ont paru différents selon la nature des lésions. A partir de la peau séborrhéique ou du comédon, le staphylocoque est très généralement dénué de pouvoir pathogène. Par contre, en règle générale, ceux issus de papules ou de pustules coagulent le plasma oxalaté, fermentent le mannitol et élaborent l'hémolysine  $\alpha$ , caractères propres aux staphylocoques pathogènes (2). Il est curieux de constater que ces germes doués de propriétés pathogènes ne provoquent qu'une pustule et ne donnent généralement pas naissance à de véritables furoncles. S'agit-il d'un antagonisme bactérien entre *Corynebacterium* et staphylocoque, ce fait résulte-t-il d'une implantation plus superficielle du staphylocoque ou bien le germe ne trouve-t-il pas dans le sébum les conditions nécessaires au développement de tous ses moyens d'attaque ? Il est certain que les interactions de ces deux germes restent à élucider.

*Essais thérapeutiques.* — Sabouraud a bien montré que le microbacille de la séborrhée était l'expression microbienne constante de ses lésions, sans pouvoir affirmer qu'il en était la cause. C'est qu'en effet l'expérimentation sur l'animal avec les germes spécialisés des lésions épidermiques était, et demeure, peu probante car la peau des animaux ne ressemble que de très loin à la peau humaine et la flore bactérienne cutanée du lapin ou de la souris est restreinte et très différente de celle de l'homme.

Tout au plus avons-nous pu tuer la souris en deux à trois jours par injection sous-cutanée de 0,5 cm<sup>3</sup> de nos cultures de *Corynebacterium acnes* (environ 1 milliard 500 millions). En conséquence, il nous a semblé qu'une première justification de l'hypothèse selon laquelle cette bactérie joue un rôle prépondérant dans l'éclosion de l'acné pourrait être apportée si des résultats très favorables étaient obtenus en vaccinant des sujets atteints de cette affection. Dans ce but, nous avons expérimenté, avec A. Bocage, un auto-vaccin constitué par *Corynebac-*

(2) J. PILLET, *Sur certains produits élaborés par les staphylocoques pathogènes*. Thèse Fac. Méd. Paris, 1948, Foulon éditeur.



*terium* tué par la chaleur à 70° et surtout un vaccin combiné contenant différents types de staphylocoques pathogènes et le *Corynebacterium* isolé chez le malade, les deux espèces bactériennes étant mises en suspension dans l'anatoxine staphylococcique purifiée. Les premiers résultats laissent présager une efficacité certaine d'un tel vaccin. Ils nous incitent à approfondir l'étude des agents étiologiques et du terrain vraiment particulier de l'acné juvénile et à poursuivre ces essais thérapeutiques fondés sur une vaccinothérapie spécifique polyvalente.

(Institut Pasteur. Annexe de Garches.)

## NOTE

### SUR L'ACTION *IN VITRO* DE LA CHLOROMYCÉTINE SUR LE BACILLE DE WHITMORE

par R. CROS et J. DEMARCHI.

Les divers agents thérapeutiques, utilisés dans le traitement de la mélioïdose, n'ont guère donné, jusqu'à ce jour, de résultats satisfaisants, sauf dans quelques rares formes chroniques.

Green et Mankikar (1, 2) ont cependant montré, par la méthode des cupules, que la chloromycétine est active *in vitro* sur le bacille de Whitmore à la concentration de 60  $\mu$ g par centimètre cube.

D'autre part, Woodward, Smadel, Ley, Green et Mankikar (3) ont établi que l'on peut obtenir une concentration dans le sang de 40 à 80  $\mu$ g de cet antibiotique par centimètre cube à la suite de la mise en charge et que l'on peut maintenir cette concentration à 20  $\mu$ g par centimètre cube.

A l'occasion de l'isolement d'un bacille de Whitmore du liquide pleural et des crachats d'un malade hospitalisé, nous avons recherché *in vitro* l'action de la chloromycétine sur 6 souches de ce germe récemment isolées :

H. 999-49 (W. 1) isolée par hémoculture chez un malade atteint de forme septicémique suraiguë entraînant la mort en cinq jours. Culture dissociée « R » et « S ».

P. 1875-49 (W. 2) provenant d'un épanchement pleural survenu au cours d'un pneumothorax thérapeutique. Culture dissociée « R » et « S ».

P. 1922-49 (W. 3) isolée des crachats du malade ayant présenté l'épanchement pleural, origine de la souche W. 2. Colonies exclusivement « S ».

P. 1922-49 (W. 4), même provenance que la souche précédente. Colonies exclusivement « R ».

P. 1985-49 (W. 5) provenant du même épanchement pleural après

(1) GREEN and MANKIKAR, *Brit. med. J.*, 1949, n° 4.598, 308.

(2) GREEN and MANKIKAR, *Trans. Roy. Soc. trop. Medic. Hyg.*, 1949, 43, 57.

(3) WOODWARD, SMADEL, LEY, GREEN and MANKIKAR, *Ann. int. Med.*, 1948, 29, 131.

traitement d'une semaine à la chloromycétine. Culture dissociée « R » et « S ».

P. 2015-49 (W. 6) isolée d'une pleurésie purulente compliquant un pneumothorax thérapeutique pour tuberculose pulmonaire. Culture dissociée « R » et « S ».

« Les souches W. 3 et W. 4 proviennent du même ensemencement présentant des colonies « R » et « S » qui, repiquées séparément, ont gardé leurs caractères initiaux dans les subcultures. Il n'en a pas été de même pour les autres souches dont les colonies de type « R » et « S » ont toujours donné des cultures dissociées. »

Nous rapportons ici les résultats de ces recherches.

Nous avons utilisé, pour cela, la méthode d'essai en milieu liquide que nous avons préférée à la *gutter method* de Fleming. Des concentrations de chloromycétine, allant de 0,5  $\mu\text{g}$  à 1.024  $\mu\text{g}$  par centimètre cube suivant une progression géométrique de raison 2, ont été réalisées dans des tubes à essais contenant exactement 10  $\text{cm}^3$  de bouillon peptoné. Afin d'équilibrer les résultats, chaque souche à tester a été ensemencée sur 5 séries des diverses concentrations ainsi que sur un tube témoin (0,1  $\text{cm}^3$  de culture de quarante-huit heures par tube).

Nous avons choisi, comme test de lecture, l'inhibition totale de la culture et recherché le point critique de 50 p. 100, tel qu'il est décrit par Reed et Muench (4), c'est-à-dire la concentration de chloromycétine à laquelle 50 p. 100 des cultures seront totalement inhibées.

Deux lectures ont été pratiquées : l'une vingt-quatre heures, l'autre sept jours après l'ensemencement. Les tableaux I et II ci-après en donnent les résultats :

Dans les tableaux I *bis* et II *bis*, ci-dessous, nous avons rassemblé et extrapolé les résultats des lectures après vingt-quatre heures et sept jours pour l'ensemble des cinq séries de chaque souche. Ces opérations vont nous servir au calcul du point critique de 50 p. 100, selon la méthode préconisée par Reed et Muench.

Le point critique est de 6,8  $\mu\text{g}$  pour la lecture de vingt-quatre heures et de 121,5  $\mu\text{g}$  pour la lecture de sept jours.

En examinant séparément le comportement de chacune des souches vis-à-vis de la chloromycétine, nous pouvons constater que la souche W. 4 s'est montrée beaucoup moins sensible à l'action de l'antibiotique que les 5 autres souches. L'inhibition totale de la culture dans 50 p. 100 des ensemencements n'est obtenue qu'avec une concentration de 45,2  $\mu\text{g}$  (lecture de vingt-quatre heures) et 512  $\mu\text{g}$  (lecture de sept jours) par centimètre cube. Rapprochons ce fait de la morphologie des colonies de cette souche qui sont exclusivement « R ».

Avec l'ensemble des souches W. 1, W. 2, W. 3, W. 5 et W. 6, sur lesquelles l'action de l'antibiotique est analogue, nous obtenons le point critique de 50 p. 100 avec une concentration de 2,95  $\mu\text{g}$  après vingt-quatre heures et 93,7  $\mu\text{g}$  après sept jours.

INTERPRÉTATION ET CONCLUSIONS. — 1° Nous pouvons déjà constater, d'après les tableaux I et II :

(4) REED and MUENCH, *Am. J. Hyg.*, 1938, **27**, 493.

TABLEAU I. — Lecture après 24 heures.

		0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1.024
W. 1	1	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0
W. 2	1	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0
W. 3	1	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0
W. 4	1	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0
	2	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0
	3	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0
	4	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0
	5	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0
W. 5	1	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0
W. 6	1	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0

0, absence totale de culture; +, cultures.

L'action certaine de la chloromycétine sur le bacille de Whitmore ;

La différence marquée du taux de concentration nécessaire pour inhiber les cultures, suivant que les lectures sont faites après vingt-quatre heures (inhibition totale à 8  $\mu\text{g}$  par centimètre cube pour 5 souches, à 64  $\mu\text{g}$  pour la sixième), ou après sept jours (inhibition à une concentration variant de 128 à 1.024  $\mu\text{g}$  par centimètre cube) ;

L'existence d'une souche W. 4 beaucoup moins sensible à l'action de l'antibiotique, ce fait étant surtout évident dans la lecture de vingt-quatre heures. Cette souche ne présente que des colonies « R » ;

L'identité du comportement de la souche W. 5, isolée après traitement du malade à la chloromycétine pendant sept jours, et de celui des souches W. 2 et W. 3 isolées chez le même malade avant traitement.

2° Les résultats obtenus par la recherche du point critique de 50 p. 100 confirment ces constatations et permettent d'apporter, sur la

TABLEAU II. — Lecture après 7 jours.

		0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1.024
W. 1	1	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0
	2	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0
	3	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0
	4	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0
	5	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0
W. 2	1	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0
	2	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0
	3	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0
	4	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0	0
	5	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0
W. 3	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0
	2	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0
	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0
	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0
	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0
W. 4	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0
	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0
	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0
	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0
W. 5	1	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0
	2	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0
	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0
	4	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0
	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0
W. 6	1	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0
	2	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0
	3	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0
	4	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0
	5	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0	0

0, absence totale de culture ; +, cultures.

concentration en chloromycétine nécessaire pour assurer l'inhibition totale de 50 p. 100 des ensemencements, les précisions suivantes :

Cette concentration est de 6,8  $\mu\text{g}$  pour l'ensemble des souches et de 2,95  $\mu\text{g}$  pour les souches W. 1, W. 2, W. 3, W. 5 et W. 6 après vingt-quatre heures, 121,5  $\mu\text{g}$  et 93,7  $\mu\text{g}$  respectivement après sept jours, c'est-à-dire 18 fois plus élevée dans ce dernier cas ;

Elle est 15 fois (lecture de vingt-quatre heures) et 5,5 fois plus élevée (lecture de sept jours) pour la souche W. 4, par rapport aux 5 autres souches. Ce fait est à rapprocher du caractère exclusivement « R » des colonies.

Cette action *in vitro* de la chloromycétine sur le bacille de Whitmore, que nous allons essayer de confirmer sur le cobaye, laisse espérer, du fait des concentrations que l'on peut obtenir dans le sang, que cet antibiotique pourra être utilisé avec succès en thérapeutique, tout au



TABLEAU I bis. — Lecture après vingt-quatre heures.

µg.	RÉSULTATS BRUTS		RÉSULTATS EXTRAPOLÉS		POURCENTAGE inhibition
	0	+	0	+	
0,5 . . . . .	0	30	0	134	0
1 . . . . .	0	30	0	104	0
2 . . . . .	0	30	0	74	0
4 . . . . .	1	29	1	44	2,2
8 . . . . .	25	5	26	15	63,4
16 . . . . .	25	5	51	10	83,6
32 . . . . .	25	5	76	5	93,8
64 . . . . .	30	0	106	0	100,0
128 . . . . .	30	0	136	0	100,0
256 . . . . .	30	0	166	0	100,0
512 . . . . .	30	0	196	0	100,0
1.024 . . . . .	30	0	226	0	100,0

TABLEAU II bis. — Lecture après sept jours.

µg.	RÉSULTATS BRUTS		RÉSULTATS EXTRAPOLÉS		POURCENTAGE inhibition
	0	+	0	+	
0,5 . . . . .	0	30	0	255	0
1 . . . . .	0	30	0	225	0
2 . . . . .	0	30	0	195	0
4 . . . . .	0	30	0	165	0
8 . . . . .	0	30	0	135	0
16 . . . . .	0	30	0	105	0
32 . . . . .	0	30	0	75	0
64 . . . . .	8	22	8	45	15,0
128 . . . . .	18	18	26	23	53,0
256 . . . . .	22	8	48	11	81,3
512 . . . . .	28	2	76	3	96,2
1.024 . . . . .	29	1	105	1	99,0

moins dans certaines formes cliniques de mélioïdose. L'observation d'un malade, que nous publierons incessamment en collaboration avec les médecins traitants, semble apporter confirmation de cet espoir.

(Institut Pasteur de Saigon.)

ACTION DE L'AURÉOMYCINE *IN VITRO*

par MARGUERITE AITOFF.

L'échantillon d'auréomycine, dont nous nous sommes servi, nous a été donné, à New-York, par le Dr Thomson, du New-York Hospital, et nous tenons à l'en remercier ici très sincèrement.

C'est une poudre jaune très soluble, même à froid.

La solution à 1 p. 100, dans l'eau distillée, est un liquide limpide jaune d'or, d'un pH aux environs de 8,0.

En présence de protides, il se forme un précipité abondant qui va en diminuant jusqu'à 0,005 p. 100.

Si l'on dissout l'auréomycine dans l'eau distillée jusqu'à 1/1.000, le précipité ne se produit plus avec les protides, même à 1/2.000.

C'est ce procédé que nous avons adopté pour nos expériences, après nous être assurée, par des essais préliminaires, que le produit était actif bien au delà de ces dilutions.

Nous avons adopté, pour le dosage de l'activité bactériostatique, la méthode des dilutions successives en milieu liquide.

Une série de tubes, remplis avec des doses décroissantes d'auréomycine, dans un milieu d'autolysat de levures, était ensemencée avec une quantité fixe de différents microbes (à  $10^{-4}$  cm<sup>3</sup> ou  $10^{-3}$  cm<sup>3</sup>).

Le dernier tube clair, après une incubation de vingt heures à l'étuve, montrait la limite du pouvoir bactériostatique.

Une préparation microscopique et une subculture des trois ou quatre derniers tubes clairs indiquaient si on avait affaire à un phénomène de bactériostase ou de bactéricidie.

Un premier coup d'œil sur le tableau I montre :

A. — Un écart considérable entre le pouvoir inhibitif :

Pour le staphylocoque Gram + . . . 1/5.000.000

et les Gram — (*Escherichia coli*). . . 1/200.000 (25 fois moins).

B. — Cet écart est encore plus considérable si on considère le pouvoir bactéricide de l'auréomycine vérifié par subculture.

Tandis que pour le staphylocoque, l'inhibition reste inchangée : 1/5.000.000.

Elle n'est plus que de 1/20.000 pour l'*Escherichia coli* et 1/2.000 pour le bacille d'Eberth, le paratyphique A et B, c'est-à-dire, respectivement, 250 fois et 2.500 fois moins que pour les staphylocoques.

Cette particularité d'action, d'ailleurs assez fréquente, non seulement pour les antibiotiques, mais aussi pour les antiseptiques, rapproche l'auréomycine de la pénicilline, dont l'action sur le staphylocoque est de 100-500 fois supérieure à celle exercée sur l'*Escherichia coli in vitro*.

Nous avons fait régulièrement des préparations microscopiques avec le contenu des premiers tubes où la culture était visible.

Tandis que les staphylocoques ne présentent aucune modification appréciable, tant au point de vue morphologique que tinctorial, les Gram —, au contraire, sont caractérisés par des modifications morpho-

TABLEAU I. — Pouvoir bactéricide de l'auréomycine.

MICROBES ÉTUDIÉS	0,1	0,05	0,02	0,01	0,005	0,002	0,001	0,0005	0,0002	0,0001	0,00005	0,00002	0,00001	TÉMOIN
<i>Streptocoque</i> 4533 . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+
<i>Staphylocoque aureus</i> . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> 5244 . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> 4942 . . . . .	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Proteus</i> 4723 . . . . .	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Proteus</i> X <sub>19</sub> . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+
<i>Eberthella typhi</i> 4616 . . . . .	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Paratyphique A 5045 . . . . .	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Paratyphique B 5175 . . . . .	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Bacille pyocyanique 5040 . . . . .	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

La ligne inférieure correspond aux repiquages (subcultures).

logiques très importantes, variées, et qui semblent constantes pour chaque espèce microbienne.

L'*Escherichia coli* se présente sous l'aspect de longs filaments enchevêtrés.

Les individus isolés sont souvent étirés, effilés en pointe aux extrémités, avec un renflement médian, quelquefois, aussi, ils présentent des boules détachées ou accolées au corps microbien.

Ces formes sont analogues à celles qui ont été décrites, par Levaditi, sous l'action de la pénicilline.

L'*Eberthella typhi*, d'une dilution de 1/20.000 d'auréomycine, présente des formes longues, épaisses, dépassant plus de cinq fois les formes normales ; à la dilution de 1/50.000, les formes sont à peine plus longues que la normale.

Le paratyphique B présente, à la dilution de 1/20.000, une coloration bipolaire nette avec un étranglement médian.

Mais les formes les plus intéressantes, aux mêmes dilutions, sont représentées par le paratyphique A.

Ces formes simulent, à s'y méprendre, des chaînettes de streptocoques, parfois assez longues, souples et enroulées.

A des dilutions plus grandes, on ne trouve plus que quelques rares chaînettes, mais des formes en biscuits, avec coloration bipolaire très prononcée.

La solution d'auréomycine, à 1 p. 100, dans l'eau distillée, laissée à la température du laboratoire, change de coloration et devient marron de plus en plus foncé.

Nous avons voulu nous rendre compte si ce changement de coloration, dû vraisemblablement à une oxydation, correspondait à une modification de l'action inhibitive.

C'est pourquoi nous avons expérimenté, comparativement, avec trois échantillons d'auréomycine :

- A. — Echantillon fraîchement dissous ;
- B. — Echantillon fraîchement dissous, chauffé quinze minutes à 100° ;
- C. — Echantillon gardé pendant un mois à la température du laboratoire devenu marron foncé (tableau II).

TABLEAU II.

	A	B	C
Staphylocoque . . . .	1/2.000 000	1/500.000	1/50.000
<i>Escherichia coli</i> . . . .	1/100 000	1/10.000	1/500
S/C. . . . .	20	50	100

S/C, rapport des dilutions inhibitives pour le staphylocoque aux dilutions inhibitives pour l'*Escherichia coli*.

Nous voyons que, d'une part, dans les deux cas, tant avec le chauffage pendant quinze minutes à 100° (échantillon B) qu'avec celui gardé un mois à la température du laboratoire (échantillon C), la perte du pouvoir inhibitif est relativement plus grande pour les Gram — que pour les Gram +.

L'échantillon B présente un pouvoir inhibitif pour le staphylocoque diminué quatre fois ; pour l'*Escherichia coli*, il l'est dix fois.

Dans l'échantillon C, ce pouvoir est diminué quarante fois pour le staphylocoque et deux cents fois pour l'*Escherichia coli*.

Ainsi le rapport des dilutions inhibitives pour le staphylocoque aux dilutions inhibitives pour l'*Escherichia coli* S/C est de 20 pour l'échantillon A, de 50 pour B et de 100 pour C.

D'autre part, on peut constater qu'un chauffage à 100°, pendant quinze minutes, détériore moins l'auréomycine qu'une température de 18° pendant un mois.

Ce même phénomène a été étudié par nous pour la pénicilline ; nous y reviendrons en détail une autre fois.

*En résumé :*

1° L'auréomycine *in vitro* a un pouvoir inhibitif beaucoup plus marqué pour les Gram positifs que pour les Gram négatifs ;

2° Cet écart est encore plus considérable si on considère le pouvoir bactéricide de l'auréomycine vérifié par subculture ;

3° Le séjour prolongé, à la température du laboratoire, détruit plus le pouvoir inhibitif de l'auréomycine qu'un chauffage à 100° pendant quinze minutes ;

4° Dans les deux cas, la perte du pouvoir inhibitif est relativement plus grande pour les Gram négatifs que pour les Gram positifs ;

5° Ces propriétés rapprochent l'action *in vitro* de l'auréomycine de celle de la pénicilline.



## ETUDE DE L'ACTION DE LA PENICILLINE *IN VITRO* SUR LES CRACHATS DESTINÉS A L'INOCULATION AU COBAYE POUR LA RECHERCHE DU BACILLE DE KOCH

par F. TISON.

A l'heure actuelle, l'inoculation au cobaye reste le procédé le plus sensible pour la mise en évidence du bacille de Koch (1, 2). Mais encore ne faut-il pas qu'un traitement préalable du produit tue une grosse partie des bacilles de Koch, sous prétexte de détruire les germes associés. C'est là, cependant, le résultat des traitements par la soude et l'acide sulfurique (3).

C'est pourquoi, au laboratoire central de Praz-Coutant, des milliers d'inoculations ont été pratiquées autrefois avec des crachats frais, lavés, non préparés. Même avec des animaux très vigoureux, 5 p. 100 au moins des cobayes étaient tués par une suppuration banale.

On peut en sauver un certain nombre par la sulfamidothérapie en injection [Hauduroy (4)] ou *per os* (3).

Dans un mémoire de ces *Annales* (5), nous avons préconisé, en 1947, une méthode d'inoculation qui a trouvé un accueil favorable.

La pénicilline tuant le cobaye (5, 6), il était impossible de traiter préventivement l'animal par des injections dont la répétition aurait été d'ailleurs fastidieuse. Nous avons donc imaginé de traiter préalablement le crachat *in vitro* à 37° par la pénicilline.

Les résultats dépassèrent les espérances. Non seulement les cobayes mouraient plus de suppuration banale, mais la méthode avait gagné en sensibilité et en rapidité. La période anté-allergique de l'animal se trouvait raccourcie.

Cela était dû à l'absence de l'action retardatrice provoquée par la réaction locale (7).

Disposant maintenant d'un recul plus grand, nous avons voulu faire le bilan de cette méthode.

935 inoculations ont été pratiquées depuis ;

6 animaux seulement sont morts de suppuration banale.

Nous inoculons les cobayes dès qu'ils pèsent 250 g environ. Ceci est vrai pour les crachats recueillis directement ou par tubage gastrique.

[Pour les urines, par exemple, le déchet est plus grand car le coli-

(1) F. TISON, *Sem. Hôp. Paris*, 1949, n° 9, 389.

(2) HAUDUROY, *Soc. franç. Biol. clin.*, novembre 1949.

(3) F. TISON, ces *Annales*, 1947, 73, 186.

(4) HAUDUROY, BOUVIER et ROSSET, *C. R. Soc. Biol.*, 1945, 139, 354.

(5) F. TISON, ces *Annales*, 1946, 73, 407.

(6) GERNEZ-RIEUX, SEVIN et BEERENS, *Bull. Acad. Méd.*, 1948, 132, 496.

(7) F. TISON, ces *Annales*, 1948, 74, 512.

bacille est peu influencé par la pénicilline. Il faut alors associer la technique de Hauduroy (4)].

Certains auteurs, tant en France qu'à l'étranger, ont confirmé nos excellents résultats.

D'autres ont été moins heureux.

La méthode a été reprise par de nombreux manuels et traités, mais avec un manque de précision :

La dose de pénicilline trop forte peut tuer l'animal.

Une mauvaise diffusion de l'antibiotique, ou un séjour trop court à l'étuve à 37°, peut laisser survivre des germes pyogènes. Nous nous sommes, en conséquence, efforcé de fixer le plus rationnellement possible le mode de préparation.

Nous mettant dans les plus mauvaises conditions possibles, nous avons collecté les crachats purulents émis pendant plusieurs jours par 4 malades. Ces crachats étaient surinfectés, en particulier, par du pneumocoque et du staphylocoque.

Or, le décès du cobaye, entre le troisième et le sixième jour, a lieu habituellement au cours d'une suppuration à pneumocoque.

10 cm<sup>3</sup> de chacun de ces 4 crachats ont été collectés et mélangés *intimement* avec une partie égale de sérum physiologique stérile.

A titre de témoin, 2 cm<sup>3</sup> de l'émulsion ont été inoculés sous la peau de la cuisse de 4 cobayes et 1 goutte mise en culture comme il sera décrit plus loin.

Il a alors été ajouté en mélangeant soigneusement :

Au crachat n° 1 . . . . .	III gouttes de pénicilline G à 5.000 U. O. par cm <sup>3</sup> .
Au crachat n° 2 . . . . .	VI gouttes de pénicilline G à 5.000 U. O. par cm <sup>3</sup> .
Au crachat n° 3 . . . . .	IX gouttes de pénicilline G à 5.000 U. O. par cm <sup>3</sup> .
Au crachat n° 4 . . . . .	XII gouttes de pénicilline G à 5.000 U. O. par cm <sup>3</sup> .

Les récipients stériles couverts ont été mis à l'étuve à 37°.

Des prélèvements ont alors été échelonnés après une demi-heure, une heure et demie, trois heures, six heures, douze heures, vingt-quatre heures de contact à l'étuve.

Ils ont été étudiés par culture et par inoculation.

1° *Etude par ensemencement sur gélose nutritive.* — Il a été utilisé des tubes de gélose, fraîchement préparés, tous de la même fournée.

Une goutte de l'émulsion de crachat a été prélevée, lavée dans du sérum physiologique stérile, et diluée dans 2 cm<sup>3</sup>.

Cette dilution était ensemencée à raison de 1 goutte par tube de gélose.

Le tableau I montre les résultats. La numération moyenne des colonies de staphylocoques et de pneumocoques a été faite après vingt-quatre heures.

Il apparaît que le pneumocoque est plus facilement éliminé que le staphylocoque, et qu'après douze heures de contact la flore pyogène associée est pratiquement éliminée.

2° *Etude par inoculation au cobaye.* — Aux mêmes heures, 2 cm<sup>3</sup> de mélange étaient prélevés et inoculés sous la peau de la cuisse de jeunes cobayes de même poids.

A la soixante-douzième heure, l'autopsie était faite pour étudier la réaction locale.

TABLEAU I. — Nombre de colonies sur gélose après vingt-quatre heures de contact avec la pénicilline.

NOMBRE de gouttes 5,000 U. O. par cm <sup>3</sup>	TÉMOIN	CONTACT AVEC PÉNICILLINE						NUMERO
		1/2 heure	1 h. 1/2	3 heures	6 heures	12 heures	24 heures	
III gouttes	Staphylocoque, 42 colonies.	0	2	0	2	3	0	1
	Pneumocoque, 90 colonies.	0	5	1	0	0	0	
VI gouttes	Staphylocoque, 32 colonies.	30	22	5	0	0	0	2
	Pneumocoque, 45 colonies.	3	5	0	0	0	0	
IX gouttes	Staphylocoque, 150 colonies.	48	40	23	2	3	2	3
	Pneumocoque, 10 colonies.	3	0	0	0	0	0	
XII gouttes	Staphylocoque, 21 colonies.	33	12	2	2	0	0	4
	Pneumocoque, 23 colonies.	0	0	0	0	0	0	

Les résultats sont concrétisés dans le tableau ci-après :

Les cobayes témoins sont morts entre la vingtième et la trentième heure avec des lésions diffuses et étendues de l'abdomen.

L'action optima de la pénicilline semble se situer vers la douzième heure.

Après vingt-quatre heures de contact, on peut penser que la pénicilline est en partie détruite et que la flore associée prend un nouvel essor.

3° *Conclusions.* — Une quantité de pénicilline G de III à IV gouttes par centimètre cube de crachat semble suffisante. A ces doses, on ne risque pas de tuer l'animal par l'action toxique de l'antibiotique. Il est sans action sur le bacille de Koch (8).

La durée de contact optima semble être de douze heures (en pratique, on préparera les inoculations le soir pour les faire le lendemain matin).

Une bonne émulsion en milieu aqueux bien homogène à pH neutre est indispensable.

(8) F. TISON, ces *Annales*, 1947, 73, 684.

TABLEAU 11. — **Résultat de l'autopsie des cobayes au troisième jour.**

	TÉMOIN	CONTACT AVEC PÉNICILLINE					
		1/2 heure	1 h. 1/2	3 heures	6 heures.	12 heures.	24 heures.
1	Mort entre 20 <sup>e</sup> et 30 <sup>e</sup> heure, suppuration diffuse.	Abcès anorexie.	Petit abcès.	Empâtement.	Réaction locale.	Petite réaction.	Petite réaction.
2	Mort entre 20 <sup>e</sup> et 30 <sup>e</sup> heure, suppuration diffuse, hémorragie.	Gros abcès anorexie.	Abcès	Petit abcès.	Empâtement.	Réaction.	Exitus suppuration.
3	Mort entre 20 <sup>e</sup> et 30 <sup>e</sup> heure, suppuration diffuse.	Abcès anorexie.	Petit abcès.	Empâtement.	Réaction locale.	Petite réaction.	Petite réaction.
4	Mort entre 20 <sup>e</sup> et 30 <sup>e</sup> heure, suppuration diffuse.	Abcès anorexie.	Abcès.	Empâtement.	Très légère réaction.	Petite réaction.	Gros abcès.

On peut déplorer que la solution de pénicilline G soit de conservation limitée. Si le débit est insuffisant, un flacon entamé est un flacon perdu.

On peut éviter cet inconvénient en ajoutant la pénicilline en poudre, prélevée avec une anse de platine stérile.

On saura qu'un flacon de 100.000 U. O. doit permettre environ 60 inoculations.

Ce procédé original d'inoculation, par sa sécurité, sa sensibilité, la précocité de sa réponse allergique, semble actuellement le moyen le plus sensible de mettre en évidence les bacilles de Koch.

Une expérience de près de 1.000 inoculations permet désormais de l'apprécier à sa valeur.

(Sanatorium de Praz-Coutant, Haute-Savoie.)

## RECHERCHES SUR LES MÉTHODES DE MESURE DU POUVOIR AMMONIFICATEUR D'UNE TERRE

par J. KAUFFMANN et M<sup>le</sup> M. A. CHALVIGNAC.

Le phénomène de l'ammonification, bien que d'une très grande importance, n'a suscité qu'un petit nombre de recherches.

Récemment Pochon et Tchan (1) ont tenté d'élaborer un ensemble

(1) J. POCHON et Y. T. TCHAN, ces *Annales*, 1947, 73, 696.

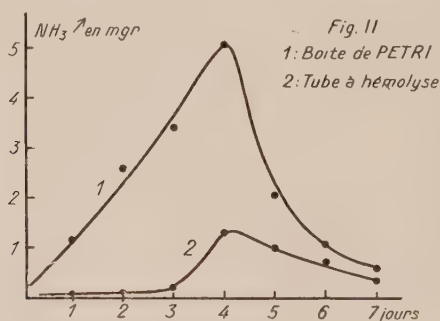




2° Influence du rapport  $\frac{\text{surface}}{\text{volume}}$ . — La terre est répartie d'une part dans des boîtes de Petri de 45 mm. de diamètre et d'autre part dans des tubes à hémolyse de dimension 70×10 mm. à raison de 5 g de terre par tube et par boîte. On ajoute l'urée et on humidifie comme dans l'expérience précédente. Les tubes à hémolyse sont placés dans des tubes à essais de diamètre 18 mm contenant 3 cm<sup>3</sup> de SO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> N/50.

On bouche les tubes à essais pour éviter la fixation de NH<sub>3</sub> atmosphérique. Dans les deux cas, on suit chaque jour le dégagement de NH<sub>3</sub> fixé par SO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> (les boîtes de Petri de 45 mm sont placées dans des boîtes de Petri de 100 mm contenant 10 cm<sup>3</sup> de SO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> N/50). Les résultats obtenus sont résumés dans la figure 2.

On voit ainsi par l'examen des deux courbes toute l'importance du rapport  $\frac{\text{surface}}{\text{volume}}$ . Dans les conditions d'expérience, le volume



de NH<sub>3</sub> dégagé est pratiquement proportionnel à la surface. Pour rechercher la cause de cette variation, nous avons fait l'expérience suivante :

On répartit la terre dans les boîtes de 45 mm de diamètre et dans les tubes à hémolyse suivant les mêmes conditions que dans l'expérience précédente. Deux lots sont stérilisés. On réserve deux témoins non stériles. On ajoute sur chaque échantillon de terre 0,5 cm<sup>3</sup> d'une solution ammoniacale 0,27 (sol. à 2,5 p. 100), soit 1,89 mg de NH<sub>3</sub> pour 5 g de terre.

Après huit jours à l'étuve à 34°, on dose l'NH<sub>3</sub> fixé par l'acide et l'NH<sub>3</sub> retenu dans la terre libérable par entraînement à la vapeur d'eau après alcalinisation par CO<sub>3</sub>Na<sub>2</sub>.

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau ci-joint.

On voit ainsi que les quantités de NH<sub>3</sub>, retenues par la terre par voie biologique dans les deux conditions différentes (boîtes de Petri et tubes à hémolyse), sont pratiquement identiques. Ce qui diffère, c'est la fixation par voie physico-chimique, celle-ci étant plus forte dans le cas des tubes à hémolyse que dans le cas des boîtes de Petri.

Nous avons également tenté d'utiliser l'appareil à perfusion de Lees pour la mesure de l'ammonification. Dans ce but, quelques modifi-

cations ont été apportées à l'appareil, à savoir : la substitution d'un tube de plus grande contenance (nos expériences se faisant avec 10 g de terre) et la captation de  $\text{NH}_3$  dégagé dans une fiole contenant

	BOITE DE PETRI		TUBES A HÉMOLYSE	
	non stérile	stérile	non stérile	stérile
$\text{NH}_3$ ajouté, en mg. . . . .	1,89	1 89	1,89	1,89
$\text{NH}_3$ fixé par $\text{SO}_4\text{H}_2$ , en mg. . . . .	0,850	1,258	0	0,136
$\text{NH}_3$ dégagé par entraînement, en mg. . . . .	0,101	0,144	0,748	1,358
$\text{NH}_3$ retenu dans le sol . . . . .	0,94	0,49	1,14	0,40

10  $\text{cm}^3$  de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  N/50. Nous avons porté le volume de l'eau du ballon à 300  $\text{cm}^3$ .

La mise au point de l'appareil pour assurer une montée lente et continue de l'eau à travers la colonne de terre est délicate. En effet, malgré un réglage lent du débit de l'eau, il se produit bientôt après l'imprégnation complète de la terre une accumulation de liquide amenant celle-ci à saturation et arrêtant ainsi le circuit. Pour remédier à cet inconvénient, nous avons introduit une fine tige de verre au centre de la colonne de terre, assurant ainsi une meilleure circulation de l'air. L'appareil est mis à l'étuve à 36°.

Chaque jour, on dose :

1° L' $\text{NH}_3$  dégagé et retenu par  $\text{SO}_4\text{H}_2$  dans la fiole ;

2° L' $\text{NH}_3$  contenu dans l'eau, libérable par entraînement par air privé de  $\text{NH}_3$ , après alcalinisation par  $\text{CO}_3\text{Na}_2$ .

Comparativement nous avons suivi l'ammonification à l'aide de notre méthode habituelle (technique Pochon et Tchan). Les dosages portent sur 40 g. de terre enrichie de sang à 1,2 p. 100. L'acide employé est  $\text{H}_2\text{SO}_4$  N/50. Les résultats obtenus sont les suivants :

MÉTHODE DE LEES  
( $\text{NH}_3$  en mg.  
dans la fiole)

MÉTHODE POCHON

1 <sup>er</sup> jour . . . . .	0,13	0,034
2 <sup>e</sup> jour . . . . .	0,12	0,127
3 <sup>e</sup> jour . . . . .	0,30	0,74
5 <sup>e</sup> jour . . . . .	1,79	6,85
6 <sup>e</sup> jour . . . . .	0,91	5,13
9 <sup>e</sup> jour . . . . .	0,8	4,62
11 <sup>e</sup> jour . . . . .	0,74	4,08
12 <sup>e</sup> jour . . . . .	0,27	1,08
13 <sup>e</sup> jour . . . . .	0,13	0,51

L' $\text{NH}_3$  dégagé et retenu dans la fiole à  $\text{SO}_4\text{H}_2$  (méthode de Lees), est en quantité très faible, car il est bien évident que la majorité de  $\text{NH}_3$  dégagé passe en solution dans le liquide de perfusion. Quant à la quantité de  $\text{NH}_3$  se trouvant dans le liquide de perfusion, il est difficile

d'en donner une mesure exacte. Les résultats sont faussés par la pullulation de germes nombreux n'appartenant pas à la flore habituelle du sol (nombreuses amibes, etc.) et qui utilisent  $\text{NH}_3$  pour leur croissance.

Il semble donc que la meilleure méthode pour mesurer le pouvoir ammonificateur d'une terre soit celle des « boîtes de Petri ». Cette méthode, simple, permet en outre de suivre l'évolution de la microflore par impression sur lame.

(O. R. S. O. M. [Laboratoire de Biologie des Sols]  
et Institut Pasteur [Service de Microbie technique].)

## ANTICORPS BLOQUANTS DANS LE SÉRUM DE SUJETS BRUCELLIQUES

### II. — LEUR RÔLE DANS LE PHÉNOMÈNE D'AGGLUTINATION PARADOXALE

par GÉRARD RENOUX.

On dit qu'il y a agglutination paradoxale (ou phénomène de zone) quand on constate l'absence d'agglutination dans certains tubes de la réaction, cependant que cette agglutination se manifeste à des dilutions plus grandes du sérum éprouvé. Ce phénomène peut se présenter sous deux aspects différents : 1° absence d'agglutination dans les premiers tubes, aux fortes concentrations du sérum et agglutination subséquente, par exemple :

1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1.280	1/2.560
—	—	—	+++	+++	+++	+++	—	—

2° Agglutination dans les premiers tubes, pas d'agglutination dans un ou plusieurs tubes intermédiaires, reprise de l'agglutination :

1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1.280	1/2.560
+++	+++	+++	—	—	+++	+++	—	—

Dans la pratique du séro-diagnostic de Wright, cette éventualité n'est pas rare et risque d'amener de fausses conclusions si la zone d'inhibition est importante. Une note, demeurée inédite, de R. M. Taylor, J. J. Phair et G. Roman, a montré que si on remplace l'eau salée à 0,85 p. 100, normalement utilisée dans l'exécution du séro-diagnostic, par de l'eau salée à 5 p. 100, on diminue ou supprime cette zone, rendant ainsi toute sa sécurité au séro-diagnostic de Wright (1).

Nous avons montré, dans une note précédente, l'existence d'anticorps bloquants dans le sérum de sujets qui, imprégnés par les *Brucella*, ont

(1) Cf. G. RENOUX, *Thèse*, Montpellier, 1939, 24 et L. CARRÈRE et H. QUATREFAGE, *Presse méd.*, 1950, 58, 518.



un séro-diagnostic négatif (2) : cette recherche se fait en présence d'eau salée à 0,85 p. 100.

Si, au contraire, à chaque tube d'un séro-diagnostic de Wright négatif exécuté selon la technique habituelle, mais avec de l'eau hypersalée à 5 p. 100, on ajoute un sérum sûrement agglutinant (de telle façon que la dilution finale de ce sérum soit 1/100), on observe, après six à douze heures à l'étuve à 37°, une agglutination complète dans chacun de ces tubes, et ce, quelle que soit l'origine du sérum examiné.

*En présence d'eau salée à 5 p. 100, les anticorps bloquants des brucelloses ne se manifestent pas (3).*

Ce fait, facile à mettre en évidence, nous a incité à rechercher le rôle possible des anticorps bloquants dans le phénomène d'agglutination paradoxale.

I. *Recherche des anticorps bloquants, ou incomplets, dans la zone d'inhibition.* — Sept sérums, humains ou animaux, agglutinent (eau salée à 0,85 p. 100), selon le schéma :

1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/300	1/640	1/1 280	1/2.560
—	—	+++	+++	+++	+++	+++	+++	—

Si on ajoute dans les deux premiers tubes — en même temps que dans un tube témoin (suspension antigénique seule) — un sérum anti-*Brucella*, on observe une agglutination complète dans le tube témoin, et pas d'agglutination dans les tubes de la zone d'inhibition.

*Il existerait donc des anticorps bloquants dans la zone d'agglutination paradoxale.*

II. *Création artificielle d'une agglutination paradoxale.* — Si on réunit deux sérums, l'un sûrement négatif, l'autre positif, le taux final d'agglutination du mélange est fonction des quantités réciproques des sérums : par exemple, le mélange à parties égales d'un sérum agglutinant au 1/120 et d'un sérum négatif agglutine au 1/2.560.

Si on ajoute à un sérum agglutinant les *Brucella* un sérum qui contient des anticorps bloquants vis-à-vis de ces germes, on constate un phénomène nouveau. Soit, par exemple, un sérum qui agglutine au 1/1.280 la souche *Br. abortus* « S. 6 » et un sérum bloquant au 1/80 le séro-diagnostic de Wright fait en double (eau salée à 0,85 et eau salée à 5 p. 100) donne les résultats suivants (V. tabl.).

Le taux final d'agglutination du mélange d'un sérum sûrement agglutinant et d'un sérum bloquant est proportionnel au volume occupé par le sérum agglutinant dans le volume total du mélange, mais, en même temps, nous voyons dans les premiers tubes de la réaction une zone d'inhibition ; l'intensité du phénomène d'agglutination paradoxale varie selon la quantité de sérum bloquant qui entre dans le mélange.

Connaissant les titres initiaux d'agglutination ou de « blocage »

(2) G. RENOUX, ces *Annales*, 1950, **78**, 798 ; depuis la publication de cette note, 50 sérums témoins et 22 sérums de sujets brucelliques ont été essayés : les résultats confirment pleinement les premières conclusions.

(3) Expérience faite sur les 43 sérums de sujets certainement brucelliques qui présentaient, en eau salée à 0,85 p. 100, des anticorps bloquants manifestes.

— avec le mélange à parties égales :

NaCl p. 100.	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1.280	1/2.560
0,85. . . .	—	—	++	+++	+++	+++	+++	—	—
5 . . . . .	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	—	—

— avec des proportions différentes (une partie de sel agglutinant, deux parties de sérum bloquant).

NaCl p. 100.	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1.800	1/2.506
0,85. . . .	—	—	—	—	+++	+++	+	—	—
5 . . . . .	+++	+++	+++	+++	+++	+++	—	—	—

de sérums donnés, on peut prévoir et le titre final de l'agglutination et l'intensité de la zone d'inhibition.

La présence d'une forte concentration en électrolytes (emploi de la solution de chlorure de sodium à 5 p. 100) empêche la formation d'une zone dans les mélanges de sérums bloquants et agglutinants comme dans les sérums qui présentent naturellement cette caractéristique.

*Conclusions.* — L'emploi, dans la pratique du séro-diagnostic de Wright, d'eau hyperchlorurée à 5 p. 100 permet d'inhiber l'action de l'anticorps bloquant éventuellement présent dans le sérum examiné : un sérum ainsi traité, s'il ne contient que l'anticorps incomplet, se comporte comme un sérum réellement négatif ; s'il contient un mélange d'anticorps incomplet et d'agglutinine, seule l'agglutinine pourra agir, l'agglutination se fait sans zone paradoxale ; plus rien ne distinguera ce sérum d'un sérum positif ordinaire.

Le phénomène dit d'agglutination paradoxale ou de zone, que l'on constate parfois dans les séro-diagnostics de la fièvre ondulante, est dû — au moins en ce qui concerne les cas où l'inhibition se produit dans les premiers tubes de la réaction — à la présence d'anticorps incomplet, bloquant, dans le sérum éprouvé. Aux fortes concentrations du sérum, la présence d'un excès de cet anticorps bloquant empêche les agglutinines normales d'agir, la suspension antigénique reste homogène ; quand la dilution du sérum est suffisante, les agglutinines se trouvent en excès, leur action devient possible et l'agglutination s'objective normalement.

(Laboratoire de Microbiologie. Faculté de Médecine, Montpellier.  
Professeur L. CARRÈRE.)

**NOUVELLE TECHNIQUE  
POUR LA RECHERCHE DU BACILLE DE KOCH  
DANS LE LAIT PAR CULTURE  
(APPLICATION DE LA MÉTHODE D'OGAWA)**

par G. ROULIN.

De nombreux essais ont été faits pour mettre en évidence, par culture, le bacille de Koch du lait. Rappelons, en particulier, les techniques employant la soude et l'acide sulfurique, la technique de Thomas (1) à l'alcool-ammoniaque, celle de Wolters et Dehmel à l'acide chlorhydrique à 15 p. 100 et enfin celle de Corper et Stoner (2) au phosphate trisodique à 10 p. 100, qui donnerait des résultats excellents, mais dont nous n'avons pas encore l'expérience.

Sur les conseils de M. R. Buttiaux, chef de service du Laboratoire d'Hygiène du lait de l'Institut Pasteur de Lille, nous avons cherché à appliquer au lait, produit si abondamment souillé par des germes de genres et espèces multiples, la technique proposée par Ogawa (3) pour les selles, exactement sa technique n° 3 qui fait agir la trypaflavine, l'antiformine et l'acide sulfurique. Mais, dans le détail, nous avons été amené à d'assez nombreuses et importantes modifications.

Les réactifs utilisés sont les suivants :

1° Une solution de trypaflavine en eau distillée à 0,1 p. 100.

2° Une antiformine spéciale, de formule ci-dessous, due à M. Cousse-macq, chimiste de l'Hôpital Militaire de Lille.

Préparer les solutions suivantes :

a) Une solution de NaOH, en eau distillée, à 15 p. 100 : 500 cm<sup>3</sup>.

b) Une solution de CO<sub>3</sub> Na<sub>2</sub>, en eau distillée, à 8 p. 100 : 100 cm<sup>3</sup>. Dissoudre à chaud.

c) Une solution de chlorure de chaux, à 100 degrés chlorométriques en eau distillée ; 5 g. p. 300 cm<sup>3</sup>. Epuiser le chlorure de chaux petit à petit avec les 300 cm<sup>3</sup> d'eau.

Mélanger les solutions b) et c). Laisser en contact douze heures, décarter, filtrer si nécessaire.

Puis mélanger enfin avec la solution a).

De cette antiformine mère, nous faisons une dilution à 15 p. 100 en eau distillée, qui peut se conserver plusieurs mois.

3° De l'acide sulfurique à 0,25 p. 100 en volume.

La technique que nous avons finalement adoptée est la suivante :

Prendre 100 cm<sup>3</sup> de lait. Centrifuger trente minutes à 4.200 tours. Au moins à titre provisoire, et nous basant sur les résultats des études d'Auguste Lumière et M<sup>me</sup> A. Dubois [1931] (4), M. Warnery [1933] (5),

(1) M. THOMAS, *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **130**, 512.

(2) H. J. CORPER et R. E. STONER, *J. Lab. Clin. Med.*, 1946, **31**, 1364.

(3) Tatsuji OGAWA, *Beitr. klin. Tuberk.*, 1933, **83**, 539.

(4) A. LUMIÈRE et M<sup>me</sup> A. DUBOIS, *C. R. Acad. Sci.*, 1931, **192**, 21.

(5) M. WARNERY, *Revue Tub.*, 1933, 959.

Ch. Gernez, P. Crampon et E. Lefort [1937] (6), qui s'accordent pour affirmer, sinon la présence exclusive, tout au moins, la très grosse prédominance des bacilles de Koch dans le culot, nous ne conservons que celui-ci et rejetons crème et petit lait.

Broyer soigneusement le culot, avec un agitateur en verre, dans 8 cm<sup>3</sup> d'un mélange, préparé extemporanément, fait de 5 cm<sup>3</sup> de trypan-flavine à 0,1 p. 100 et de 3 cm<sup>3</sup> d'antiformine à 15 p. 100. Laisser en contact trente minutes à la température du laboratoire.

Nouvelle centrifugation de vingt-cinq minutes à 4.800 tours. Le tube montre alors un petit culot, gros comme un grain de blé, un liquide jaune clair, parfaitement limpide, et, en surface, une couche pellucide parfois très mince et à peine visible, parfois beaucoup plus nette. Cette couche, si mince soit-elle, renferme de nombreux bacilles de Koch, aussi faut-il la respecter soigneusement. Prendre une pipette Pasteur, pipette à boule de préférence, la monter au bout d'un tube de caoutchouc assez long pour suivre parfaitement l'aspiration, aspirer et jeter tout le liquide clair, la couche de surface, mise à sec, venant s'appliquer au fond et sur les bords du tube.

Ajouter alors 6 cm<sup>3</sup> d'acide sulfurique à 0,25 p. 100. Emulsionner et laisser en contact trente minutes.

Dernière centrifugation de vingt minutes à 4.200 tours. On obtient un petit culot, et en surface, une pellicule est encore parfois visible, quoique plus mince, qu'au stade précédent. On la respecte alors en procédant de la même manière pour le rejet du liquide clair.

Enfin, l'on ensemence le mélange culot et pellicule superficielle sur 6 tubes de milieu de Petraghiani ou de Lœwenstein-Jensen, tout d'abord à l'ose, puis à la pipette, en réalisant un véritable lavage du tube à centrifuger avec le liquide de condensation des milieux à ensemençer, voire avec un peu d'eau physiologique, sans dépasser 0,5 cm<sup>3</sup> par tube. Ces derniers tubes, ainsiensemencés avec le liquide de lavage, seront laissés inclinés dans l'étuve pendant la nuit entière avant d'être remis en position verticale.

Nous examinons régulièrement les cultures deux fois par semaine en inclinant le tube, à chaque fois, pour humidifier tout le milieu avec le liquide de condensation. Il nous est apparu que cette pratique accélérât en effet l'apparition des colonies et donnait une pousse beaucoup plus abondante.

A défaut de laits certainement bacillifères, nos manipulations ont porté tout d'abord sur 60 laits crus, artificiellement infectés avec des souches humaines (H 37 Rv) ou bovines (bovine Ravenel), cultivées en milieu de Dubos liquide, à raison de 11 gouttes de culture pure pour 100 cm<sup>3</sup> de lait dans nos premiers essais, puis avec des dilutions de plus en plus étendues, pour atteindre le taux de 1/1.000, le lait représentant ainsi une dilution de la culture à 1/1.000.000. A ce taux, l'examen direct des culots d'ensemencement n'a jamais permis de déceler de B. K.

Un témoin était fait chaque fois en ensemençant la même quantité de bacilles sur un autre tube du même milieu de culture.

Les résultats peuvent être ainsi schématisés :

(6) Ch. GERNEZ, P. CRAMPON et E. LEFORT, *C. R. Soc. Biol.*, 1937, **126**, 48



1° Nous avons obtenu des macrocultures d'une façon constante, même avec la dose infectante minima (12 essais à ce taux).

2° La date d'apparition des colonies est donnée par le tableau ci-dessous.

	DÉLAI D'APPARITION DES PREMIÈRES COLONIES en jours			
	Bacille humain		Bacille bovin	
	Tubes réaction	Tubes témoin	Tubes réaction	Tubes témoin
Minimum . . . .	14	14	21	14
Maximum . . . .	24	21	38	30
Moyenne . . . .	20	16	27	22

Nous voyons ainsi que le bacille bovin nous a donné des cultures moins rapides, fait en accord avec la notion bien connue qu'il se développe mal sur les milieux glycinés. D'où la nécessité de faire lesensemencements, au moins en partie, sur milieu non glyciné, puisque l'infection du lait peut être due aussi bien au bacille humain, par contamination secondaire, qu'au bacille bovin par tuberculose de l'animal.

En règle générale, les colonies des tubes réaction étaient tout d'abord moins nombreuses que celles du tube témoin, mais l'écart s'atténuait, et parfois même disparaissait lorsqu'on prolongeait l'observation. Le traitement subi par le lait semble ainsi déterminer un léger retard du développement de la culture, sans altérer notablement un nombre appréciable de bacilles.

Après cette période de mise au point, nous sommes passé à l'application pratique de la méthode sur des laits de vache réagissant à la tuberculine. Nos résultats sont restés régulièrement négatifs, mais le fait est en accord avec les études récentes de Kastli (7) et Filipovitch (8), qui tendent à établir que le bacille ne passe dans le lait qu'en cas de mammite. D'ailleurs, des inoculations au cobaye ont été concurremment pratiquées, et aucun des animaux n'a présenté de lésions tuberculeuses.

Il faut souligner un point important et très avantageux de cette technique. C'est la *rareté des souillures* observées sur les milieux de culture par les germes banaux du lait. Sur un total de 282 tubes, nous n'en relevons que 19, soit 6,7 p. 100. Nous opposerons ces chiffres à ceux de Pierre Gibert (9) qui, sur 276 tubesensemencés après traitement à la soude, en relève 200 contaminés, soit 72 p. 100 et sur 81 tubesensemencés avec la méthode de Thomas, en note encore 14, soit 17 p. 100.

Tous les auteurs ont souligné les difficultés du problème auquel nous nous sommes attaqué de nouveau et les deux écueils auxquels

(7) P. KASTLI, *Schweiz. Archiv Tierheilk.*, 1947, **89**, 103.

(8) FILIPOVITCH et DJOURICHITCH, *Bull. Acad. Méd.*, 1949, **133**, 796.

(9) P. GIBERT, *Recueil Travaux Inst. nat. Hyg.*, 1946, 731.

on s'est heurté jusqu'ici ; des produits antiseptiques trop forts détruisant le bacille, de plus faibles laissant apparaître de nombreuses souillures. Ainsi l'ont fait en particulier M. Warnery (5), R. Legrand, Ch. Gernez, P. Crampon et E. Lefort (10, 11).

Nous n'avons pas fait jusqu'à présent d'études comparatives. Cependant, nous croyons que le procédé que nous proposons, par sa positivité constante avec une dose infectante réduite et par la rareté des souillures observées, réalise un progrès très sensible sur les méthodes habituellement employées jusqu'ici.

(Laboratoire d'Hygiène du Lait de l'Institut Pasteur de Lille  
et Laboratoire de Bactériologie de la 2<sup>e</sup> Région militaire.)

Les communications suivantes paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur* :

**Recherches physiologiques sur *Endosporum azotophagus* (Tchan et Pochon, 1950) fixateur d'azote**, par Y. T. TCHAN.

**Etudes sur le collagène. V. Collagénases bactériennes et pouvoir anti-collagénasique des sérums humains**, par A. DELAUNAY, M. GUILLAUMIE, A. BOUJNAH et A. BASSET.

**Antibiotiques et lyse bactériophagique. V. Sur la fixation et la multiplication d'un phage staphylococcique Twort en présence de streptomycine**, par E. EDLINGER.

**La pyrimidine, facteur de croissance pour les *Sporotrichum***, par E. DROUHET et F. MARIAT.

**Action de l'aneurine et de ses constituants sur quelques Mucovacées pathogènes**, par F. MARIAT et E. DROUHET.

**Etudes immunochimiques de fractions antigéniques et d'un polyside de *Salmonella typhi* Vi**, par P. GRABAR et P. CORVAZIER.

**Stabilité des types bactériophagiques de *Salmonella typhi* B et valeur épidémiologique de la lysotypie par la méthode de Félix et Callow**, par P. NICOLLE, A. JUDE et R. BUTTIAUX.

**Evolution et conditions de stérilisation de cultures bactériennes en présence de bactériophages**, par R. WAHL et A. TERRADE.

**Multiplication des bactériophages et des bactéries chez les souris infectées par *Salmonella enteritidis* (variété Danisz)**, par R. WAHL et A. TERRADE.

(10) R. LEGRAND, Ch. GERNEZ, P. CRAMPON et E. LEFORT, *C. R. Soc. Biol.*, 1938, 428, 204.

(11) E. LEFORT, *Contribution à l'étude de l'infection tuberculeuse du lait*, Thèse Lille, 1938.

## LIVRES REÇUS

**William Norman Pickles.** — *Epidemiology in Country Practice*. John Wright and sons Ltd., Bristol, 1939, 112 pages, 21,5 × 14 cm. Prix : 10 sh. 6.

Ce petit livre, extrêmement sympathique, retrace sous une forme vivante l'expérience d'un médecin de campagne en matière d'épidémiologie, et à propos des différentes maladies infectieuses rapportées donne un exposé documenté des données pratiques sur lesquelles repose notre science de l'épidémiologie et de la prophylaxie des maladies infectieuses. Après avoir exposé les raisons qu'il a de se livrer à cette étude, l'auteur traite successivement la description de la campagne anglaise où il exerce son activité professionnelle et les moyens de communication qui l'unissent au reste du monde, puis apporte son expérience personnelle de l'épidémiologie des maladies les plus communes : rougeole, oreillons, etc. Des chapitres sont réservés en particulier au problème de la varicelle et du zona, à la dysenterie bacillaire, à l'hépatite épidémique et enfin à la myalgie épidémique. Il s'agit d'une réimpression d'un ouvrage publié en 1939, aussi peut-on regretter que l'auteur n'ait pas tenu compte des acquisitions de l'épidémiologie au cours de ces dix dernières années. Il est difficile aujourd'hui de parler de la maladie de Bornholm sans rapprocher cette infection de la fièvre de coxsackie. Cette critique n'enlève rien à l'attrait d'un livre extrêmement vivant et qui a l'avantage de montrer à l'étudiant que l'épidémiologie, expérience quotidienne du praticien, ne repose pas uniquement sur de froides statistiques.

P. E.

**Cecil A. Hoare.** — *Handbook of Medical Protozoology*. Baillière, Tindall and Cox, 7 and 8 Henrietta Street, London W.C.2, 1949, 334 pages, 23 × 16 cm. Prix : 35 sh.

Exposé consciencieux, élémentaire et souvent assez schématique de la protozoologie de l'homme, surtout dans ses applications à la pathologie tropicale. Certains chapitres tels ceux des leishmanies ou des trypanosomes sont assez complètement traités pour que les étudiants y trouvent une bonne vue d'ensemble. D'autres, comme celui consacré aux toxoplasmes, sont traités d'une façon rudimentaire, difficilement conciliable avec l'intérêt du sujet. Les illustrations sont claires et correctes, mais toujours schématiques.

P. E.

**H. E. Nieburgs.** — *Hormones in Clinical Practice*. Cassell and Co Ltd., 1949, 388 pages, 14,5 × 22. Prix : 25 sh.

Rédigé surtout à l'usage du praticien, cet ouvrage comporte 26 chapitres traitant des applications cliniques de l'endocrinologie à propos desquelles la posologie et le mode d'administration des différentes préparations sont décrits en détail. Les techniques récentes, comme celle



de l'implantation de pellets d'œstrogènes, sont décrites avec un luxe de détails pratiques et d'illustration qui permet au praticien d'appliquer la thérapeutique nouvelle. Un chapitre sur les méthodes diagnostiques comprend une étude de la cytologie des frottis vaginaux à l'état normal ou pathologique, de même que sous l'influence des différentes thérapeutiques hormonales, illustré par une série de 25 photomicrographies remarquables. L'ensemble du livre est du reste très bien illustré. Chaque chapitre comporte les références bibliographiques du sujet et l'ouvrage se termine par les tables de données numériques (relation, taille, poids, etc.), données malheureusement en mesures anglaises.

P. L.

**H. N. Green et H. B. Stoner.** — *Biological Actions of the Adenine nucleotides*, H. K. Lewis and Co Ltd., London, 1950, XV + 221 pages, 22 × 15 cm.. Prix : 25 sh.

La guerre a provoqué en Grande-Bretagne toute une série de travaux sur le traitement du choc traumatique qui ont abouti à des résultats remarquables et à des conclusions d'une valeur permanente. Le professeur Green a pris une part de premier plan à ces recherches poursuivies sous l'égide du Medical Research Council de Grande-Bretagne. En 1942, il a présenté avec ses collaborateurs un rapport au Medical Council qui faisait le point des travaux originaux poursuivis sous sa direction et notamment soulignait l'importance de l'A.T.P. (triphosphate d'adénosine) dans la genèse et le traitement du choc traumatique. Le présent ouvrage constitue un développement sur ce rapport historique à la lumière des travaux poursuivis depuis. En 13 chapitres, l'auteur y traite de la chimie des nucléotides de l'adénine, le métabolisme du triphosphate d'adénosine, l'action biologique générale de l'A.T.P. et les effets des composés puriques sur le système cardio-vasculaire, sur le système respiratoire, l'influence du magnésium sur l'activité des nucléotides, celle du calcium dans l'embolie pulmonaire, enfin le choc dû à l'A.T.P. et les agents thérapeutiques que l'on peut lui opposer. L'ouvrage se termine sur l'étude du rôle possible des nucléotides dans les différents états pathologiques.

Plus encore peut-être que pour le traumatologiste, ce petit livre, lourd de faits expérimentaux d'une valeur de premier choix, sera pour le physiologiste un précieux ouvrage de référence.

P. L.

---

Le Gérant : G. MASSON.



# SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

## ASSOCIATION DES MICROBIOLOGISTES DE LANGUE FRANÇAISE

(Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15°.)

### EXTRAIT DES STATUTS :

**Article premier.** — L'association dite Association des Microbiologistes de Langue Française, fondée en 1937, à Paris, a pour but de grouper les Microbiologistes de langue française et de créer entre eux un lien. Elle a son siège à Paris.

L'association se compose de membres nationaux et de membres étrangers de toutes langues.

La langue française est la langue officielle des Congrès de l'Association et celle de la publication de ses travaux.

**Art. 2.** — L'A. M. L. F. est instituée uniquement pour l'étude et la discussion en commun de toutes les disciplines relevant de la science microbiologique.

**Art. 3.** — Les membres nationaux de l'A. M. L. F., ainsi que les membres étrangers résidant habituellement en France constituent la Section française de l'A. M. L. F. ou SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE. La Section française de l'A. M. L. F. reçoit dans l'intervalle des Congrès une délégation permanente du Conseil de l'A. M. L. F. Son activité est régie par un règlement intérieur, approuvé par l'Assemblée Générale.

**Art. 4.** — La Section française de l'A. M. L. F. ou SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE, constitue de plein droit la Section française de l'Association internationale de Microbiologie.

**Art. 5.** — Peut faire partie de l'Association toute personne remplissant une fonction scientifique dans un laboratoire de microbiologie (microbiologie pure ou appliquée, bactériologie, pathologie infectieuse, immunologie, sérologie, chimiothérapie, cancérologie), ou ayant publié des travaux scientifiques de microbiologie.

**Art. 23.** — *Publications* — Les publications des travaux exposés dans les séances mensuelles se font dans les conditions et selon les modalités décidées par le Bureau de la Section française.

Le Bureau peut refuser de publier tout travail ou communication, qui ne serait pas conforme aux buts de l'association ou au caractère de ses publications. Ses décisions sont sans recours.

**Art. 27.** — Les auteurs des communications et démonstrations devront être membres de l'Association. Les étrangers à l'Association ne seront acceptés comme auteurs que s'ils ont pour co-signataire un membre de l'Association, ou s'ils ont été invités par le Bureau à faire une communication, ou si un membre de l'Association ayant assisté aux recherches rapportées se charge de discuter le travail en séance.

En dehors des Congrès, dont la périodicité et la date sont fixées par l'Assemblée Générale sur la proposition du Bureau, l'Association se réunit en séances consacrées à des communications scientifiques, *le premier jeudi de chaque mois* (août et septembre exceptés), à 16 heures. Les séances ont lieu au Grand Amphithéâtre de l'Institut Pasteur ; elles sont publiques.

Les membres désirant présenter des communications sont priés d'en aviser le Secrétaire général, et de lui en communiquer le titre, pour permettre l'établissement de l'ordre du jour de la réunion.

Le texte des communications doit être remis à la séance, établi *in varietur*, en exemplaire dactylographié original. La bibliographie



des auteurs cités sera établie, conformément aux règles admises par l'Association Internationale de Microbiologie, dans l'ordre suivant : nom de l'auteur, *titre* du périodique (en abrégé et en italiques), *année* de publication, *tome* (en chiffres arabes gras), *page*. Les signes t., p., etc., sont supprimés. Les abréviations des noms de périodiques courants figurent sur une liste qui sera adressée aux auteurs, sur leur demande. Les figures illustrant le texte doivent être remises avec leurs clichés typographiques, sinon il pourra en résulter des délais de publication. La Rédaction se charge, le cas échéant, de faire faire tous les dessins, graphiques, tracés, et de faire cliquer, aux frais des auteurs, tous les documents qui lui seront adressés à temps, soit huit jours au moins avant la séance, pour parution dans le numéro suivant des *Annales de l'Institut Pasteur*.

Le Secrétaire général : P. LÉPINE.

## Séance du 1<sup>er</sup> juin 1950.

### SOMMAIRE

Pages.

#### Communications :

Trois cas d'infection de laboratoire par le virus de la maladie de Newcastle, par P. LÉPINE, P. ATANASIU et M <sup>lle</sup> G. GAREAU . . . . .	193
Remarques sur l'agglutination des globules rouges de mouton par le virus de la poliomyélite, souche MM, par MIREILLE CASTAMBIÉ-ODIER . . . . .	197
Isolément d'un virus de cobaye à Brazzaville, par A. PÉLISSIER, J. CECCALDI et H. ARNOULT . . . . .	200
Septicémie due à <i>Clostridium oedematis</i> type A chez les tortues rayées de Madagascar ( <i>Testudo radiata</i> Shaw), par A.-R. PRÉVOT, ACH. URBAIN, J. NOUVEL et GENEVIÈVE PIETTE . . . . .	203
Étude d'une souche de <i>Ple tridium carnis</i> (Klein) Prévot isolée d'une enzootie dannoise du vison, par D. SOMPOLINSKY . . . . .	204
Toxicité périodique des solutions de toxines précipitées de <i>Bact. ærogenes</i> , par A. GREGUER . . . . .	206
Contribution à l'étude de la physiologie des bacilles acido-alcoolo-résistants. — I. Les échanges gazeux, par JEAN DESBORDES et ÉTIENNE FOURNIER . . . . .	208
Contribution à l'étude de la physiologie des bacilles acido-alcoolo-résistants. — II. L'équipement enzymatique, la virulence et les indicateurs colorés de rH, par JEAN DESBORDES et ÉTIENNE FOURNIER . . . . .	210
Contribution à l'étude de la physiologie des bacilles acido-alcoolo-résistants. — III. L'action du P.A.S. sur les enzymes du bacille de Koch, par JEAN DESBORDES et ÉTIENNE FOURNIER . . . . .	212
Contribution à l'étude étiologique et thérapeutique de l'acné juvénile, par PIERRE MERCIER et JEAN PILLET . . . . .	215
Note sur l'action <i>in vitro</i> de la chloromycétine sur le bacille de Whitmore, par R. CROS et J. DEMARCHI . . . . .	217
Action de l'aureomycine <i>in vitro</i> , par MARGUERITE AITOFF . . . . .	222
Étude de l'action de la pénicilline <i>in vitro</i> sur les crachats destinés à l'inoculation au cobaye pour la recherche du bacille de Koch, par F. TISON . . . . .	222
Recherches sur les méthodes de mesure du pouvoir ammonificateur d'une terre, par J. KAUFFMANN et M <sup>lle</sup> A. CHALVIGNAC . . . . .	222
Anticorps bloquants dans le sérum de sujets brucelliques. — II. Leur rôle dans le phénomène d'agglutination paradoxale, par GÉRARD RENOUX . . . . .	232
Nouvelle technique pour la recherche du bacille de Koch dans le lait par culture (application de la méthode d'Ogawa), par G. ROULIN . . . . .	233
Livres reçus . . . . .	233